



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales



ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE CELOBIOHIDROLASAS FÚNGICAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN

Por Lic. Romina O. CONIGLIO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina

2017

Director
Dr. Pedro D. ZAPATA

Co-directora
Dra. María I. FONSECA

TRIBUNAL EXAMINADOR (Resolución Consejo Directivo N° 588-17)

Dra. Laura LEVIN

Universidad Nacional de Buenos Aires

Dr. Mauro GRABIELE

Universidad Nacional De Misiones

Dr. Javier LIOTTA

Universidad Nacional de Misiones

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Disposición N° 2104-17)

Posadas, 20 de diciembre de 2017

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE CELOBIOHIDROLASAS
FÚNGICAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL PROCESO DE
SACARIFICACIÓN**

Romina O. Coniglio

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis

Laboratorio de biotecnología molecular, Instituto de Biotecnología Misiones
“María Ebe Reca” (InBioMis), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales, Universidad Nacional de Misiones
COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N° 417-14)

Dra. Marina I. QUIROGA

Universidad Nacional de Misiones

Dr. Mauro GRABIELE

Universidad Nacional de Misiones

Dra. Marta VATTUONE

Universidad Nacional de Tucumán

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Proyecto de Carrera N° 10933/11
Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación
Universitaria (CONEAU) N° 344/11.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi director, el Dr. Pedro Zapata por abrirme las puertas del laboratorio 204 primero y del InBioMis más tarde, permitiéndome ser parte de este hermoso equipo desde ya hace más de ocho años. Es gracias a él también que conocí la biotecnología y el maravilloso mundo de los hongos, mis apasionantes objetos de estudio.

Quiero agradecer muy especialmente a mi co-directora, la Dra. María Isabel Fonseca por guiarme con sabiduría y paciencia y tranquilizarme en muchos momentos recordándome que estaba transitando un camino de aprendizaje.

Quiero decir gracias también:

A la Dra. Laura Villalba, directora del InBioMis por su apoyo constante.

A los miembros de la comisión de supervisión, Dres. Mauro Gabriele, Marina Quiroga y Marta Vattuone por acompañarme y aconsejarme a lo largo de todo este proceso y a los miembros del jurado, Dres. Laura Levin, Javier Liotta y Mauro Gabriele por la lectura minuciosa de este manuscrito y sus muy valiosas correcciones y sugerencias.

A la Dra. Eleonora Campos y a su equipo del laboratorio de bioenergía, CIVyA, INTA, Bs. As., Florencia, Ornella y Silvina por haberme recibido tan amablemente en su laboratorio, en el cual desarrollé parte de los experimentos de esta tesis.

A todos los docentes de los cursos de posgrado, especialmente a la Dra. Marli Camassola, Dr. Mario Rajenberg, Dr. Mario Saparrat, Dra. Laura Levin y Dr. Gerardo Robledo, por la generosidad con la que comparten sus conocimientos y transmiten su pasión por el reino Fungi.

Gracias a la cooperativa San Alberto de Puerto Rico por proporcionarnos el bagazo de mandioca y al Dr. Schmalko y a Santiago por prestarnos el molino.

Por supuesto a todas las mujeres integrantes del InBioMis, excelentes profesionales, quienes me ayudaron en muchas ocasiones e hicieron que nunca me sintiera sola durante la realización de esta tesis: Silvana, Gaby D., Karina, Lucrecia, Marcela, Adriana, Loli, Ana, Laura, Gaby A., Marilyn, March, Naty y Ceci. Gracias también a mis compañeros: Gustavo, Juan, Martín, Cristian, Gastón y Sergio.

A mis jefes de la cátedra de Física que me permitieron faltar para viajar y así poder capacitarme. Gracias Silvia, Jorge y Vania por la paciencia, sobre todo este último año.

A mi familia, Mamá y Emi. A quienes les debo poder dedicarme a lo que me gusta y más.

Y por supuesto a Lucas, al lado de quien llevo ya felizmente 10 años y 2 tesis. Gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

1D-PAGE-LC-MS: *one dimensional-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis-Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*

aas: aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNr: ADN ribosómico

ANOVA: *ANalysis Of VAriance* - análisis de la varianza

ARA: arabinosa

Arg: Arginina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Asp: Ácido Aspártico

BGL: β -glucosidasa

BLASTn: *Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide)*

BSA: ácido bicineconínico

CAZy: *Carbohydrate Active EnZymes* - enzimas activas sobre carbohidratos

Cb: celobiosa

CBD: *Cellulose Binding Domain* - dominio de unión a la celulosa

CBHI: celobiohidrolasa I

CBHII: celobiohidrolasa II

CD: *Catalytic Domain* - dominio catalítico

CEQUIBIEM: Centro de Estudios QUÍmicos y BIológicos de Espectrometría de Masa

CICVyA: Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas

CMC: carboximetilcelulosa

dc: diámetro de la colonia

DNS: *3,5-DiNitroSalicylic acid* - ácido 3,5-dinitrosalicílico

dNTPs: desoxirribonucleótido trifosfatos

DTT: ditioneitol

EG: endo-1,4- β -glucanasa

FPasa: actividad sobre papel de filtro

FPU: unidades papel filtro

Glu: Ácido Glutámico

Glu: glucosa

HCD: *High Collision Dissociation* - disociación de alta colisión

hd: halo de degradación

His: Histidina

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografía líquida de alta eficiencia

IEC: Índice de Eficiencia Celulolítica

InBioMis: Instituto de Biotecnología Misiones

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ITS: *Internal Transcribed Spacer* - región espaciadora transcrita interna

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LBM: Laboratorio de Biotecnología Molecular

LiP: lignina peroxidasa

LSD: *Least Significant Difference* - diferencia mínima significativa

Lys: Lisina

ME: *Malt Extract* - extracto de malta

MEA: *Malt Extract, Agar* - extracto de malta, agar

MnP: manganeso peroxidasa

MP: *Maximum Parsimony* - máxima parsimonia

MS: *Mass Spectrometry* - espectrometría de masas

Mu-c: 4-Metilumbeliferil- β -D-celobiósido

Mu-g: 4-Metilumbeliferil glucósido

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ND: No determinado

ND-PAGE: *Non Denaturing PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* - electroforesis no desnaturalizante

NJ: *Neighbor Joining* - vecino más cercano

PASC: *Phosphoric Acid Swelling Celulose* - celulosa amorfa regenerada

Pb: pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction - reacción en cadena de la polimerasa

Pfam: *Protein FAMILies*

PM/MM: Marcador de peso molecular

PNPC: P-nitrofenil- β -celobiosido

PNPG: P-nitrofenil- β -D-glucopiranosido

rp₂: segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II

RSM: *Response Surface Methodology* - metodología de superficie respuesta

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* - electroforesis desnaturalizante

SHF: *Separate Hydrolysis and Fermentation* - hidrólisis y fermentación separadas

SSF: *Simultaneous Saccharification and Fermentation* - sacarificación y fermentación simultáneas

TBE: Tris-Borato-EDTA (Ácido etilendiaminotetracético)

TCA: ácido tricloroacético

U.V: Ultra Violeta

U: Unidad de actividad enzimática

UNaM: Universidad Nacional de Misiones

Uniprot: *UNiversal PROTein Resource*

X1: xilosa

X2: xilobiosa

X3: xilotriosa

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas	<i>página</i>
Tabla 1: Lista de Taxa, números de acceso de <i>GenBank</i> de los marcadores ITS y <i>rpb2</i> y las referencias correspondientes utilizados en la identificación del aislamiento seleccionado.	27-28
Tabla 2: Factores evaluados en el experimento de cribado. El nivel -1 fue la ausencia del nutriente en todos los casos; se muestra la concentración correspondiente al nivel +1 para cada uno de los nutrientes.	29
Tabla 3: Matriz experimental del diseño factorial fraccionado 1/32 para determinar los componentes del medio que influyen en los niveles de actividad CBH.	30-31
Tabla 4: Factores evaluados en el experimento de superficie-respuesta. Se muestra la concentración correspondiente a los cinco niveles para cada uno de los nutrientes.	32
Tabla 5: Matriz experimental del diseño compuesto central ortogonal 2 ² +estrella.	32
Tabla 6: <i>Screening</i> en medios sólidos. La actividad EG se determinó semicuantitativamente a los 4 días utilizando el sustrato CMC y coloreando con Rojo Congo. Las actividades BGL y CBH se determinaron cualitativamente utilizando los sustratos Mu-g y Mu-c respectivamente a los 5 días de crecimiento.	47
Tabla 7: Valores de actividad CBH (en U/l) en las corridas experimentales detectadas a los 6, 12, 18 y 24 días en el cultivo sumergido de <i>T. villosa</i> LBM 033.	59-60
Tabla 8: Comparación entre las actividades enzimáticas medidas en U/l a los diferentes días de cultivo. Las cruces alineadas indican grupos homogéneos.	60
Tabla 9: Valores de actividad CBH (en U/l) en las corridas experimentales detectadas a los 12 días de cultivo de <i>T. villosa</i> LBM 033.	62
Tabla 10: Decodificación de los valores óptimos sugeridos por el modelo, actividad enzimática estimada en esas condiciones y valor real obtenido.	64
Tabla 11: Valores de actividad enzimática expresadas en U/l en el sobrenadante de cultivo de <i>T. villosa</i> LBM 033 en condiciones estandarizadas. Los valores representan las medias de los duplicados \pm el desvío estándar.	67

Tabla 12: Azúcares liberados (mg/ml) en la hidrólisis de los sustratos CMC, PASC, y xilano utilizando el sobrenadante de <i>T. villosa</i> LBM 033.	68
Tabla 13: Azúcares liberados (en mg/ml) en los ensayos de hidrólisis de residuo de cebada pretratado utilizando el sobrenadante de <i>T. villosa</i> LBM 033.	70
Tabla 14: Proteínas identificadas en el sobrenadante de cultivo de <i>T. villosa</i> a través de espectrometría de masas.	74-75
Tabla 15: Propiedades de CBHs de diferentes especies fúngicas.	90-91

<i>Figuras</i>	<i>Página</i>
Figura 1: Composición de la lignocelulosa (tomado de Kuhad <i>et al.</i> 2016, con modificaciones); estructura y composición química de la celulosa (tomado de Manavalan <i>et al.</i> , 2015 con modificaciones).	4
Figura 2: Diagrama esquemático de los pasos necesarios para la obtención de bioetanol (tomado de Payne <i>et al.</i> , 2015, con modificaciones).	6
Figura 3: Mecanismo de acción de las enzimas celulasas en la hidrólisis de la celulosa. BG: β -glucosidasas; EG: Endoglucanasas; CBHI: Celobiohidrolasa I; CBHII; Celobiohidrolasa II (tomado de Wang <i>et al.</i> 2012, con modificaciones).	11
Figura 4: Representación esquemática de la estructura general de las celulasas, consistente en un dominio catalítico (CD) y un dominio de unión a la celulosa (CBD) unidos por una bisagra. (Tomado de Sajith <i>et al.</i> 2016 con modificaciones).	12
Figura 5: <i>Screening</i> de actividad EG en placas CMC-agar. La actividad enzimática fue revelada a los 4 días de crecimiento con Rojo Congo. Los ensayos fueron hechos por duplicado para los 14 aislamientos estudiados. Se utilizó una placa no inoculada como control negativo.	44
Figura 6: <i>Screening</i> de actividad BGL en placas Mu-g-agar a los 5 días de cultivo. Los ensayos fueron hechos por duplicado para los 14 aislamientos estudiados. Se utilizó una placa no inoculada como control negativo.	45
Figura 7: <i>Screening</i> de actividad CBH en placas Mu-c-agar a los 5 días de cultivo. Los ensayos fueron hechos por duplicado para los 14 aislamientos estudiados. En cada par de placas, a la izquierda se observa el aislamiento inoculado en un medio con Mu-c y a la derecha, la placa inoculada en un medio sin el sustrato (controles negativos).	46

Figura 8: Actividades EG, BGL y CBH correspondientes a los 11 aislamientos seleccionados a los 12, 16, 20, 24, 28 y 32 días de cultivo en medio líquido Czapek suplementado con peptona y celulosa cristalina.	48
Figura 9: Detección de EGs el día de mayor actividad de cada aislamiento en geles nativos (a) y SDS-PAGE (b). Las bandas fueron detectadas por contraste con la tinción Rojo Congo. Carriles: 1: LBM 033; 2: LBM 020; 3: LBM 030; 4: LB M031; 5: LBM 038; 6: LBM 014; 7: LBM 017; 8: LBM 023; 9: LBM 021; 10: LBM 024; 11: LBM 029; MM: Marcador de peso molecular (Kaleidoscope, BioRad).	51
Figura 10: Detección de CBH el día de mayor actividad de cada aislamiento en geles nativos (a) y SDS-PAGE (b). Las bandas fueron detectadas por contraste con la tinción Rojo Congo. Carriles: 1: LBM 029; 2: LBM 033; 3: LBM 020; 4: LBM 030; 5: LBM 031; 6: LBM 038; 7: LBM 014; 8: LBM 017; 9: LBM 023; 10: LBM 021; 11: LBM 024; MM: marcador de peso molecular (Kaleidoscope, BioRad).	52
Figura 11: Árbol realizado por el método NJ, basado en el alineamiento de la secuencia de ADN _r ITS del hongo en estudio con secuencias obtenidas del <i>GenBank</i> (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de <i>bootstrap</i> de interés. El triángulo representa la especie tipo de <i>Trametes</i> .	55
Figura 12: Árbol filogenético realizado por el método MP, basado en el alineamiento de la secuencia de ADN _r ITS del hongo en estudio con secuencias obtenidas del <i>GenBank</i> (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de <i>bootstrap</i> de interés. El triángulo representa la especie tipo de <i>Trametes</i> .	56
Figura 13: Árbol realizado por el método NJ, basado en el alineamiento de la secuencia de <i>rpb2</i> del hongo en estudio con secuencias obtenidas del <i>GenBank</i> (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de <i>bootstrap</i> de interés. El triángulo representa la especie tipo de <i>Trametes</i> .	57
Figura 14: Árbol filogenético realizado por el método MP, basado en el alineamiento de la secuencia de <i>rpb2</i> del hongo en estudio con secuencias obtenidas del <i>GenBank</i> (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de <i>bootstrap</i> de interés. El triángulo representa la especie tipo de <i>Trametes</i> .	58
Figura 15: Diagrama de Pareto de los efectos promedio de los nutrientes en el medio de cultivo sobre los niveles de actividad CBH el día 12 del cultivo sumergido de <i>T. villosa</i> LBM 033. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado. Las barras más allá de la línea vertical representan los nutrientes con influencia significativa sobre la respuesta analizada con un nivel de confianza del 95 %.	61

Figura 16: Diagrama de superficie-respuesta para la actividad CBH (α :0,5 %) en el sobrenadante de 12 días de cultivo de <i>T. villosa</i> LBM 033 para los factores celulosa y sulfato de amonio (a); celulosa y peptona (b); peptona y sulfato de amonio (c).	63
Figura 17: Actividad CBH relativa a diferentes valores de pH y a 50°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.	64
Figura 18: Actividad CBH relativa a diferentes valores de temperatura y a pH 4,8. Los datos son la media de los duplicados. El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.	65
Figura 19: Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a pHs 3 y 7 (a) y 4,8 (b). El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.	66
Figura 20: Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a 30°C, 50°C (a), 60°C y 70°C (b). El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.	66
Figura 21: Productos de la hidrólisis de los sustratos CMC, PASC y xilano utilizando el sobrenadante de <i>T. villosa</i> LBM 033 determinados por HPLC. Cb: celobiosa, Glu: glucosa, X2: xilobiosa, X3: xilotriosa.	69
Figura 22: Productos de la hidrólisis del residuo de cebada pretratado con el sobrenadante de <i>T. villosa</i> LBM 033 y la enzima comercial y sus respectivos controles determinados por HPLC. ARA: arabinosa, GLU: glucosa, X1: xilosa.	71
Figura 23: Carril 1: Marcador de peso molecular Phage Ruler pre-stained protein ladder (Thermo Scientific). Carril 2: Sobrenadante de <i>T. villosa</i> en las condiciones estandarizadas de cultivo.	72
Figura 24: Secuencia aminoacídica de la CBH de <i>T. versicolor</i> . Azul: sitio de unión a la celulosa (CBM). Rojo: sitio catalítico. Los péptidos únicos identificados en <i>T. villosa</i> se encuentran subrayados.	76
Figura 25: Organización de los dominios de las enzimas pertenecientes a la familia 6 de las glicosil-hidrolasas, como la CBHII. Verde: sitio de unión a la celulosa. Rojo: Dominio catalítico (http://pfam.xfam.org/protein/Q9P8N1).	77



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales



ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE CELOBIOHIDROLASAS FÚNGICAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN

Por Lic. Romina O. CONIGLIO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina

2017

RESUMEN

Las prácticas agrícolas generan desperdicios lignocelulósicos compuestos por celulosa, hemicelulosas y lignina que pueden ser bioconvertidos por hongos para generar productos de valor agregado como los biocombustibles. En este sentido, las enzimas celulolíticas como las endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas se presentan como una alternativa para su utilización en la hidrólisis de celulosa a azúcares que pueden ser fermentados a etanol.

El objetivo general de esta tesis fue obtener un medio enriquecido en celobiohidrolasas a partir del cultivo de hongos políporos nativos de Misiones (Argentina) con características propicias para ser utilizados en el proceso de sacarificación, un paso clave en la producción de bioetanol.

En un *screening* inicial, se evaluó el potencial celulolítico de 14 políporos mediante ensayos cualitativos seleccionándose 11 aislamientos que mostraron actividad endoglucanasa, celobiohidrolasa y β -glucosidasa.

Luego, se realizó un *screening* cuantitativo en cultivos sumergidos y se seleccionó el aislamiento LBM 033 por presentar los mayores títulos de actividad enzimática para las tres celulasas. Además, los sobrenadantes de cultivo de cada aislamiento mostraron diferentes perfiles isoenzimáticos, correspondiendo la mayoría de las bandas a 45 kDa para las celobiohidrolasas y a un rango entre 69 y 88 kDa para las endoglucanasas.

El aislamiento LBM 033 fue identificado como *Trametes villosa* mediante el uso de los marcadores ITS y *rbp2* y la construcción de árboles.

La celulosa cristalina, la peptona y el sulfato de amonio afectaron ($P \leq 0,01$) a la actividad celobiohidrolasa, obteniéndose la mayor actividad enzimática luego de 12 días de cultivo. Las condiciones del medio se estandarizaron, obteniéndose el valor óptimo de 49 ± 5 U/l en las siguientes condiciones: 15 g/l de celulosa cristalina y 3 g/l de peptona y sulfato de amonio.

El sobrenadante de cultivo estandarizado de *T. villosa* LBM 033 presentó el mayor valor de actividad celobiohidrolasa a 60°C y pH 4, 8. La termoestabilidad fue mayor a 30°C seguida de 50°C, disminuyendo a temperaturas más elevadas, mientras que la actividad enzimática fue más estable a los pHs 4, 8 y 10.

El sobrenadante presentó además títulos elevados de otras actividades enzimáticas necesarias para la hidrólisis de los sustratos holocelulósicos, hidrolizando los sustratos artificiales celulósicos hasta celobiosa y glucosa. En la sacarificación del residuo de cebada pretratado por extrusión, el porcentaje de sacarificación de la holocelulosa fue del 30 %, representado probablemente por oligosacáridos reductores.

En el análisis del secretoma se logró identificar una CBHII. Además, el 66 % de las proteínas estuvieron relacionadas con la bioconversión de la biomasa lignocelulósica.

Estos resultados indican que los macrohongos de Misiones, como *T. villosa* LBM 033 pueden constituir una valiosa fuente de celulasas, especialmente celobiohidrolasas que pueden aplicarse en la etapa de sacarificación lo que podría reducir el costo total de la producción de bioetanol.

ABSTRACT

The agricultural practices generate lignocellulosic waste composed of cellulose, hemicelluloses and lignin that can be bioconverted by fungi to generate value-added products such as biofuels. In this context, cellulolytic enzymes such as endoglucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidases are presented as an alternative for their use in the hydrolysis of cellulose to sugars that can be fermented to ethanol.

The general objective of this thesis was to obtain a medium enriched in cellobiohydrolases from the cultivation of native polypore fungi from Misiones (Argentina) with favorable characteristics to be used in the saccharification process, a key step in the production of bioethanol.

In an initial screening, the cellulolytic potential of 14 polypores was evaluated by qualitative assays, selecting 11 isolates that showed endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase activity.

Then, a quantitative screening was performed in submerged cultures and the LBM033 isolate was selected because it had the highest enzymatic activity titers for the three cellulases. In addition, the culture supernatants of each isolate showed different isoenzyme profiles, most of the bands corresponding to 45 kDa for the cellobiohydrolases and to a range between 69 and 88 kDa for the endoglucanases.

The LBM 033 isolate was identified as *Trametes villosa* through the use of the ITS and *rpb2* markers and the construction of trees.

Crystalline cellulose, peptone and ammonium sulfate affected ($P \leq 0.01$) cellobiohydrolase activity, obtaining the highest enzymatic activity after 12 days of culture. The conditions of the medium were standardized, obtaining the optimum value of 49 ± 5 U / l under the following conditions: 15 g/l of crystalline cellulose and 3 g/l of peptone and ammonium sulfate.

The standardized culture supernatant of *T. villosa* LBM 033 showed the highest value of cellobiohydrolase activity at 60° C and pH 4.8. The thermostability was higher at 30°C followed by 50°C, decreasing at higher temperatures, while the enzymatic activity was more stable at pHs 4, 8 and 10.

The supernatant also showed high titers of other enzymatic activities necessary for the hydrolysis of the holocellulosic substrates, hydrolyzing the artificial cellulosic substrates up to cellobiose and glucose. In the saccharification of the pre-treated barley residue, the saccharification percentage of the holocellulose was 30 %, probably represented by reducing oligosaccharides.

In the analysis of the secretome, a CBHII was identified. In addition, 66 % of the proteins were related to the bioconversion of the lignocellulosic biomass.

These results indicate that macrofungi from Misiones, such as *T. villosa* LBM 033 can be a valuable source of cellulases, especially cellobiohydrolases that can be applied in the saccharification stage, which could reduce the total cost of bioethanol production.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Biomasa lignocelulósica	3
2.2 Bioconversión de biomasa lignocelulósica a etanol	5
2.3 Hidrólisis enzimática de la celulosa	9
2.4 Organismos degradadores de la lignocelulosa	13
2.5 Políporos de pudrición blanca del clado trametoide	14
2.6 Celulasas fúngicas	15
2.7 Investigación sobre la optimización de procesos de producción de celulasas ..	17
2.8. Eficiencia de la hidrólisis	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Selección de Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) aislados de Misiones productores de celulasas	21
<i>4.1.1 Organismos utilizados</i>	21
<i>4.1.2 Screening de aislamientos productores de celulasas en medios sólidos</i>	21
<i>4.1.3 Condiciones de cultivo para el ensayo cuantitativo</i>	22
<i>4.1.4 Medición de las actividades enzimáticas</i>	23
<i>4.1.5 Análisis estadísticos</i>	23
<i>4.1.6 Detección de isoenzimas de CBH y EG en ND-PAGE (zimogramas)</i>	24
<i>4.1.7 Determinación del peso molecular en SDS-PAGE</i>	24
4.2 Identificación molecular del aislamiento seleccionado	24

4.2.1 Extracción de ADN.....	25
4.2.2 Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2	25
4.2.3 Amplificación de la región rpb2.....	26
4.2.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	26
4.2.5 Secuenciación de los fragmentos obtenidos y análisis bioinformáticos	26
4.2.6 Construcción de árboles.....	27
4.3 Efecto de los nutrientes sobre la actividad CBH durante el cultivo sumergido del aislamiento seleccionado	29
4.3.1 Experimento de cribado	29
4.3.2 Experimento de superficie-respuesta.....	31
4.3.3 Validación del modelo estadístico.....	33
4.3.4 Análisis estadísticos.....	34
4.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad CBH y su estabilidad en el sobrenadante de cultivo	34
4.4.1 pH óptimo.....	34
4.4.2 Temperatura óptima.....	34
4.4.3 Estabilidad en pH.....	34
4.4.4 Estabilidad en temperatura.....	35
4.4.5 Análisis estadísticos.....	35
4.5 Micro-ensayos de hidrólisis enzimática sobre residuos de cebada.....	35
4.5.1 Biomasa utilizada	35
4.5.2 Determinación de las actividades enzimáticas hidrolíticas en el sobrenadante.....	36
4.5.3 Ensayos sobre residuo de cebada	37
4.5.4 Rendimiento de la hidrólisis	37
4.5.5 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de los productos de hidrólisis.....	38

4.6 Caracterización de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas	38
4.6.1 Separación de proteínas totales por SDS-page	38
4.6.2 Identificación de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas	39
4.6.2.1 Preparación de la muestra	39
4.6.2.2 Espectrometría de masas	40
4.6.2.3 Análisis de los datos	41
4.6.3 Caracterización de las proteínas identificadas	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Selección de Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) aislados de Misiones productoras de celulasas	43
5.1.1 Screening de aislamientos productores de celulasas en medios sólidos	43
5.1.2 Ensayo cuantitativo de aislamientos productores de celulasas	47
5.1.3 Análisis electroforético de CBHs y EGs	49
5.1.3.1 Perfil isoenzimático de EGs	50
5.1.3.2 Perfil isoenzimático de CBHs	51
5.2 Identificación molecular del aislamiento seleccionado	52
5.2.1 Amplificación y secuenciación de la región TS1-5,8S-ITS2	52
5.2.2 Amplificación y secuenciación de la región comprendida entre los dominios conservados 6 y 7 del gen rpb2	53
5.2.3 Construcción de árboles	53
5.3 Efecto de los nutrientes sobre la actividad CBH durante el cultivo sumergido de <i>T. villosa</i> LBM 033	59
5.3.1 Experimento de cribado	59
5.3.2 Experimento de superficie-respuesta	61
5.3.3 Validación del modelo	63

5.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad CBH y su estabilidad en el sobrenadante de cultivo	64
<i>5.4.1 pH óptimo.....</i>	<i>64</i>
<i>5.4.2 Temperatura óptima.....</i>	<i>64</i>
<i>5.4.3 Estabilidad en pH.....</i>	<i>65</i>
<i>5.4.4 Estabilidad en temperatura.....</i>	<i>66</i>
5.5 Micro-ensayos de hidrólisis enzimática sobre residuos de cebada.....	66
<i>5.5.1 Determinación de las actividades enzimáticas hidrolíticas en el sobrenadante.....</i>	<i>67</i>
<i>5.5.2 Análisis de los rendimientos de hidrólisis de los diferentes sustratos.....</i>	<i>67</i>
<i>5.5.3 Hidrólisis del residuo de cebada.....</i>	<i>69</i>
5.6 Caracterización de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas	71
<i>5.6.1 Visualización de proteínas totales separadas por SDS-page.....</i>	<i>71</i>
<i>5.6.2 Identificación de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas.....</i>	<i>72</i>
<i>5.6.3 Caracterización de la CBH.....</i>	<i>76</i>
6. DISCUSIÓN	78
6.1 Selección de Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) aislados de Misiones productores de celulasas	78
6.2 Identificación molecular del aislamiento seleccionado	82
6.3 Efecto de los nutrientes sobre la actividad CBH durante el cultivo sumergido <i>T. villosa</i> LBM 033	84
6.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad CBH y su estabilidad en el sobrenadante de cultivo	89
6.5 Micro-ensayos de hidrólisis enzimática sobre residuos de cebada.....	91
6.6 Caracterización de las proteínas secretadas en las condiciones	94
7. CONCLUSIONES	100
8. BIBLIOGRAFÍA.....	102

1. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda mundial de energía, las fuentes de petróleo inestables e inciertas y los concernientes cambios climáticos han llevado a la búsqueda del desarrollo de energías alternativas que pueden desplazar a los combustibles fósiles. En respuesta a estas inquietudes, muchos países han iniciado extensivas investigaciones y desarrollado diversos programas sobre la producción de biocombustibles (Himmel *et al.*, 2007).

El bioetanol, una fuente de energía sustentable producida a partir de recursos naturales renovables, tiene un gran potencial para reemplazar los combustibles fósiles (Gupta & Verma, 2015). La producción nacional y el uso de etanol como combustible pueden disminuir la dependencia del petróleo extranjero, reducir los déficits comerciales, crear puestos de trabajo en el área rural y reducir la contaminación del aire y la acumulación de dióxido de carbono (Prasad *et al.*, 2007).

En este sentido, la utilización de la biomasa lignocelulósica ha emergido como la tecnología más destacada para la producción eficiente de bioetanol y otros productos de valor agregado. Los biocombustibles lignocelulósicos están hechos a partir de materias primas lignocelulósicas obtenidas a partir de residuos agrícolas, hierbas y productos forestales, las cuales representan una fuente abundante y de bajo costo de carbohidratos, con la ventaja adicional de ser sustratos renovables y, por lo tanto, amigables con el medio ambiente (Bhattacharya *et al.*, 2015).

El reto principal en la conversión de la biomasa a bioetanol es lograr rendimientos que lo hagan competitivo en costos con los combustibles fósiles actuales (Dashtban *et al.*, 2009). Las enzimas encargadas de degradar la celulosa contenida en la biomasa a azúcares fermentables durante la producción de etanol se conocen colectivamente como celulasas y son producidas principalmente por hongos. Sin embargo, el alto costo de estas enzimas (el cual representa el 20-30 % del costo total del bioetanol lignocelulósico) constituye una barrera significativa para la comercialización de este biocombustible (Brijwani *et al.*, 2010).

Es por ello, que para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática se deben centrar los esfuerzos tanto en optimizar el proceso de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica como en reducir el costo de producción de las celulasas. Esto último se puede conseguir a través de la mejora de la actividad enzimática durante la fermentación y la optimización de la composición de las celulasas para potenciar el efecto sinérgico de tal manera que se mejore la actividad específica de cada una de ellas y se minimice la dosificación enzimática (Wang *et al.*, 2012; Chen & Fu, 2016).

El estudio de los sistemas de degradación de la lignocelulosa es complejo y aún falta mucho por hacer y descubrir en el campo de las celulasas, en especial las de origen fúngico (Martinez-Anaya *et al.*, 2008). La exploración de nuevos hábitats, el análisis del genoma, la minería de datos y el análisis proteómico de secretomas microbianos podrían abrir las puertas hacia nuevas enzimas y desentrañar los misterios de la interacción enzimática y la sinergia (Bhattacharya *et al.*, 2015). En este sentido, la comprensión de la fisiología y la genética de los organismos productores de enzimas lignocelulolíticas sigue siendo necesaria. A pesar de que algunas cepas de hongos tienen las ventajas de producir celulasas que muchas veces poseen la característica de ser termoestables, la mayoría de estas cepas no producen cantidades suficientes de una o más enzimas necesarias para la bioconversión eficiente de los residuos lignocelulósicos en azúcares fermentables. Mejorar la actividad hidrolítica de hongos y encontrar enzimas estables se ha convertido en una prioridad en muchos estudios recientes (Dashtban *et al.*, 2009). También se necesitarán esfuerzos similares en investigaciones que permitan obtener más información sobre la biología molecular de los hongos productores de celulasas y su regulación génica. Con el ritmo actual de investigación se puede afirmar que se generará más conocimiento en un futuro próximo que ayudará en nuestro progreso hacia una economía más verde y sostenible basada en carbohidratos (Singhania *et al.*, 2016).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa es un material orgánico renovable y el principal componente estructural de todas las plantas (Sánchez, 2009). La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de tres tipos de polímeros: **celulosa** (30 %-60 %), **hemicelulosas** (20 %-40 %) y **lignina** (10 %-25 %) (Figura 1). La abundancia relativa de estos polímeros varía de acuerdo al tipo de biomasa pero en general, constituyen aproximadamente el 90 % de la materia seca en materiales lignocelulósicos, mientras que el resto se compone de cenizas y extractivos (Kumar *et al.*, 2016).

La **celulosa**, la molécula orgánica más abundante en la Tierra, es un homopolisacárido compuesto de cadenas lineales de unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos, siendo el dímero celobiosa la unidad que se repite (Baldrian & Valášková, 2008; Nanda *et al.*, 2014). Los extremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C1) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a un número de oxidantes y se conocen como extremos reductores, mientras que el C4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (Martínez-Anaya *et al.*, 2008). Las cadenas de celulosa están unidas mediante puentes de hidrógeno formando las microfibrillas, las cuales a su vez se unen para formar las fibras de celulosa. Esta estructura se mantiene gracias a un elevado número de puentes de hidrógeno y de interacciones de Van Der Waals, que proporcionan en conjunto una unión muy fuerte, haciendo a la fibra de celulosa insoluble y muy resistente al ataque químico. Además de contener regiones cristalinas (ordenadas) resistentes a la degradación, la celulosa también incluye regiones amorfas (desordenadas), más fáciles de degradar (Hendriks & Zeeman, 2009; Guerriero *et al.*, 2016).

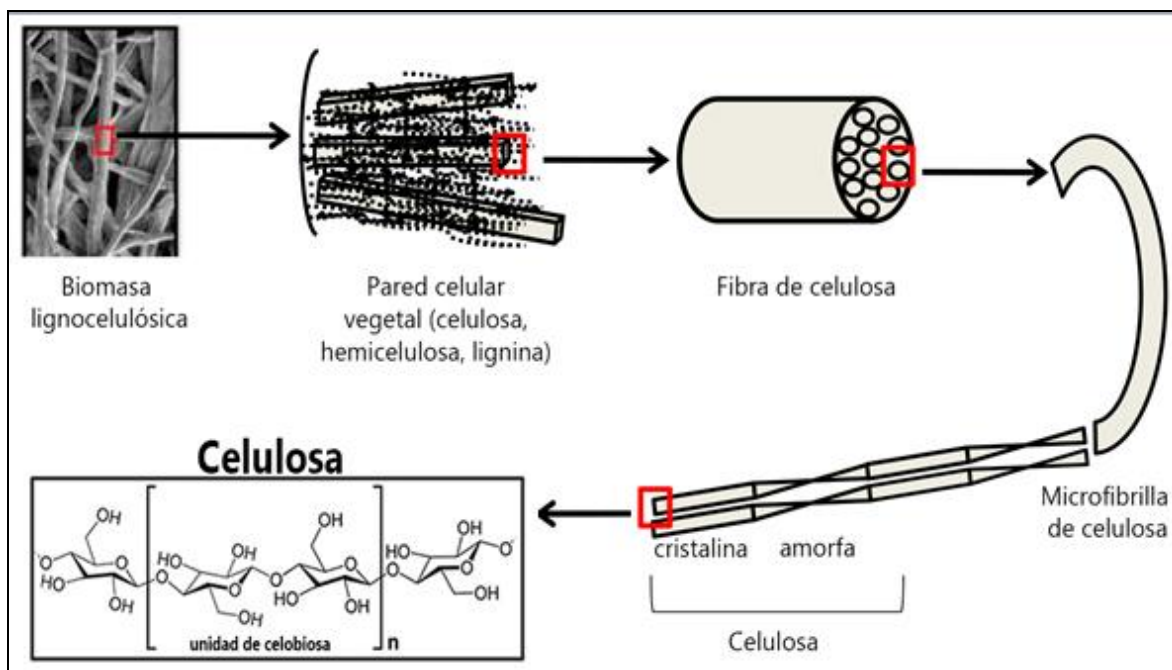


Figura 1: Composición de la lignocelulosa (tomado de Kuhad *et al.* 2016, con modificaciones); estructura y composición química de la celulosa (tomado de Manavalan *et al.*, 2015 con modificaciones).

Las **hemicelulosas**, con un peso molecular más bajo que la celulosa, son polímeros heterogéneos formados por pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa, manosa) y compuestos fenólicos enlazados entre sí por enlaces β -1,4 glucosídicos y a veces β -1,3 glucosídicos. La principal diferencia entre la celulosa y las hemicelulosas es que las hemicelulosas tienen ramas con cadenas laterales cortas constituidas por diferentes azúcares mientras que la celulosa consiste en oligómeros fácilmente hidrolizables. En la naturaleza, la composición de las hemicelulosas puede variar dependiendo de la naturaleza de la planta (Sánchez, 2009; Sajith *et al.*, 2016), sin embargo el xilano es el mayor componente estructural de las hemicelulosas vegetales y es el segundo polisacárido renovable más abundante en la naturaleza. Se trata de un polisacárido complejo que consiste en una columna vertebral de residuos de xilosa conectados por enlaces β -1,4 glucosídicos junto con trazas de L-arabinosa. La capa de xilano con su interacción covalente con la lignina y su enlace no covalente con la celulosa puede ser esencial para mantener la integridad de la celulosa *in situ* y proteger las fibras celulósicas frente a la degradación (Kumar *et al.*, 2016).

La **lignina**, el componente más recalcitrante del material lignocelulósico, es un heteropolímero amorfo, insoluble y ópticamente inactivo que consiste en unidades de fenil-propano que se organizan en una estructura de red tridimensional grande. Generalmente contiene tres alcoholes aromáticos (alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumárico). La lignina está presente en las paredes celulares formando junto con las hemicelulosas una matriz amorfa en la cual las fibras de celulosa están embebidas y su papel principal es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Hendriks & Zeeman, 2009; Shahzadi *et al.*, 2014).

Explorar el potencial de la conversión de las biomásas lignocelulósicas en productos valiosos como los biocombustibles es esencial para minimizar la necesidad de otras fuentes de energía y promover su utilización respetuosa con el medio ambiente (Nanda *et al.*, 2014).

2.2 Bioconversión de biomasa lignocelulósica a etanol

A diferencia de los combustibles fósiles, el bioetanol es una fuente de energía renovable producida a través de la fermentación de azúcares. Las plantas de bioetanol de primera generación utilizan principalmente jugo de caña de azúcar y almidón de maíz. Sin embargo, un aumento drástico en la producción de etanol utilizando esta tecnología sería controversial porque el costo de su elaboración es relativamente alto, lo cual hace difícil la competencia con los combustibles fósiles y además su producción podría requerir el empleo de las tierras destinadas a la producción de alimentos. Una alternativa de bajo costo y que elimina el conflicto con las tierras destinadas al cultivo es la producción de bioetanol de segunda generación a partir de las biomásas lignocelulósicas de los residuos agrícolas, forestales, municipales, industriales y urbanos (Sun & Cheng, 2002; Prasad *et al.*, 2007).

La producción de bioetanol comprende cuatro etapas principales: **pretratamiento**, **hidrólisis**, **fermentación** y **destilación** (Figura 2) (Aditiya *et al.*, 2016). Con el fin de mejorar el rendimiento, cada paso en el proceso de bioconversión tiene que ser optimizado (Dashtban *et al.*, 2009).

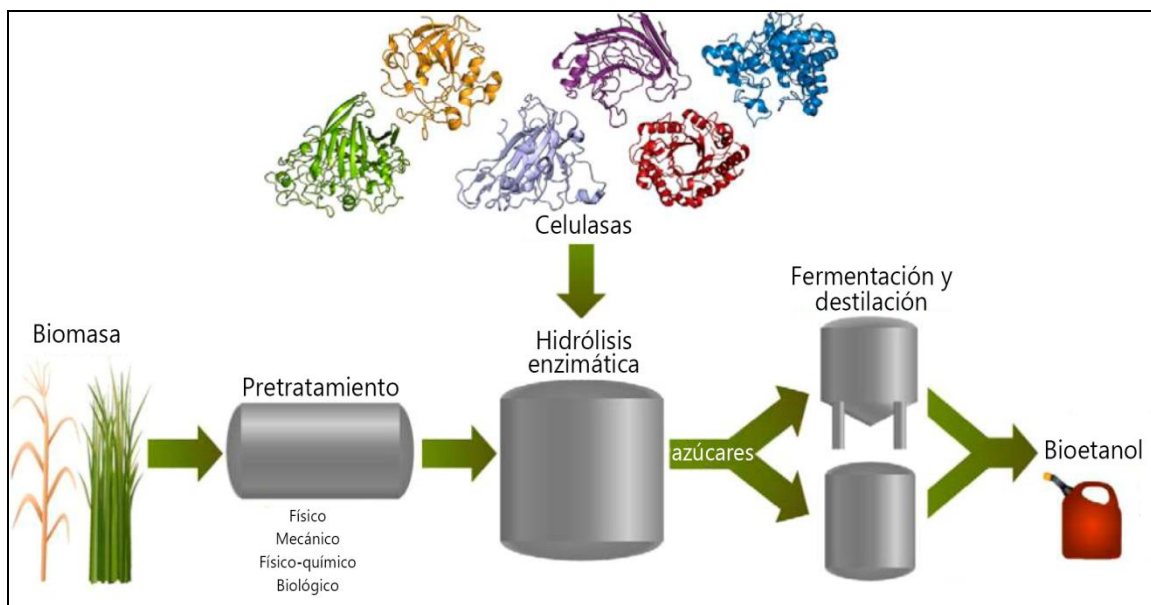


Figura 2: Diagrama esquemático de los pasos necesarios para la obtención de bioetanol (tomado de Payne *et al.*, 2015, con modificaciones).

El **pretratamiento** es el proceso que convierte cualquier biomasa lignocelulósica de su forma recalcitrante nativa en una forma completamente susceptible a la degradación enzimática (Agbor *et al.*, 2011). Según el tipo de pretratamiento, se pueden observar diferentes efectos sobre el sustrato que pueden contribuir a mejorar la hidrólisis. Algunos de estos efectos son:

- Eliminación de parte o de toda la lignina, lo que provoca una mayor porosidad en el sustrato;
- Interrupción de la estructura de la lignina y sus vínculos con el resto de la biomasa;
- Redistribución de la lignina;
- Eliminación de las hemicelulosas que dificulta el acceso de las celulasas a la celulosa;

- Alteración de la estructura hemicelulósica;
- Reducción de la cristalinidad de la celulosa;
- Reducción del grado de polimerización de la celulosa;
- Reducción del tamaño de las partículas (Van Dik & Pletschke, 2012).

Los métodos de pretratamiento pueden clasificarse en físicos (mecánicos), fisicoquímicos, químicos y biológicos (Chen & Fu, 2016). La reducción mecánica del tamaño del sustrato por molienda es a menudo el primer paso. La eliminación de la lignina por medios químicos se consigue mediante métodos tales como la hidrólisis ácida, el tratamiento con vapor o el tratamiento alcalino, lo que hace que la biomasa sea más susceptible a la degradación enzimática. La deslignificación también puede conseguirse utilizando enzimas producidas por hongos tales como lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP, EC1.11.1.13), y lacasa (EC 1.10.3.2). La principal desventaja de la deslignificación biológica es la gran cantidad de espacio requerido y los largos tiempos de cultivo (10-14 días) (Van Dik & Pletschke, 2012).

En los materiales lignocelulósicos, el pretratamiento se utiliza comúnmente para deformar los componentes rígidos, los cuales están estructurados en lignina, celulosa y hemicelulosas; resultando en la disminución del grado de cristalinidad, que se requiere como condición adecuada antes de la hidrólisis. El pretratamiento mecánico de reducción física sólo, es adecuado para el material lignocelulósico (Aditiya *et al.*, 2016).

En la **hidrólisis** o sacarificación se rompen los enlaces glucosídicos de la celulosa y las hemicelulosas para producir azúcares fermentables de cinco y/o seis carbonos (Crimes *et al.*, 2017). La hidrólisis eficiente de la biomasa lignocelulósica puede llevarse a cabo mediante hidrólisis química o enzimática. La hidrólisis química se lleva a cabo utilizando ácidos inorgánicos bajo condiciones adversas. Los hidrolizados así obtenidos contienen no sólo azúcares fermentables, sino también productos de degradación del azúcar tales como furfural que son tóxicos para los microbios usados en etapas sucesivas de fermentación por lo cual, en general, se necesitan etapas adicionales de detoxificación para eliminar los

inhibidores de los hidrolizados. En este sentido, la aplicación de enzimas para hidrolizar la celulosa sin generar subproductos es más atractiva y respetuosa con el medio ambiente (Juturu & Wu, 2014). Además, a diferencia de la hidrólisis química, la hidrólisis enzimática requiere menos energía y se lleva a cabo en condiciones suaves a un pH de 4,8 y una temperatura de 45-50°C, evitando la corrosión de los biorreactores. Aunque la hidrólisis química lleva unos pocos minutos y la hidrólisis enzimática de uno a varios días, en la hidrólisis ácida el rendimiento máximo de glucosa está limitado a aproximadamente el 60 %, mientras que la degradación enzimática tiene el potencial de producir hidrolizados con mayores rendimientos de azúcares (Oloffson *et al.*, 2008; Binod *et al.*, 2011).

La **fermentación** se lleva a cabo para convertir los azúcares monoméricos (glucosa y xilosa) en etanol (Abril & Abril, 2009). Para que un organismo pueda ser aplicado en la producción de etanol es deseable que sea capaz de dar una alta productividad y de resistir altas concentraciones de etanol. Para este propósito *Saccharomyces cerevisiae* y formas mutantes de la misma son el “caballito de batalla” entre las levaduras (Olofsson *et al.*, 2008).

Las etapas de hidrólisis y fermentación pueden ser operadas secuencialmente por hidrólisis y fermentación separadas (SHF, *separate hydrolysis and fermentation*) o conjuntamente por sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, *simultaneous saccharification and fermentation*) (Jambo *et al.*, 2016). En SHF, los materiales lignocelulósicos pretratados se hidrolizan a glucosa y posteriormente se fermentan a etanol en reactores separados. Por lo tanto, tanto la hidrólisis como la fermentación se realizan a su temperatura óptima, es decir, 50°C para la hidrólisis y 30-38°C para la fermentación. Los principales inconvenientes de este procedimiento son la inhibición del sistema enzimático por la acumulación de los productos de hidrólisis, principalmente celobiosa y glucosa. SSF es un proceso en el que la hidrólisis y la fermentación se llevan a cabo en un solo reactor. En este proceso, la glucosa liberada por las enzimas hidrolíticas se consume inmediatamente por el microorganismo fermentante presente en el cultivo, y se

mantiene una baja concentración de azúcares en el medio, reduciendo así el problema de inhibición del producto final de la enzima. La temperatura óptima para SSF se mantiene alrededor de 38°C, que es un promedio entre la temperatura óptima para la hidrólisis (45-50°C) y la fermentación (30°C-38). *Trichoderma reesei* y *S. cerevisiae* son los microorganismos comúnmente utilizados para SSF. Las principales desventajas de la SSF son la inhibición de las enzimas por el etanol producido después de la fermentación y la asociación estrecha de la levadura y las enzimas con el residuo recalcitrante provocada por la hidrólisis incompleta de los sustratos al final de la reacción. A pesar de estas desventajas, SSF es el método preferido en muchos estudios a escala piloto para la producción de etanol (Binod *et al*, 2011).

La solución de etanol resultante del proceso de fermentación necesita procesarse para eliminar el contenido de agua, dando etanol anhidro. En general, la eliminación del contenido de agua puede hacerse por **destilación**, utilizando la diferencia de los puntos de ebullición de las mezclas en una solución. Cuando la mezcla se calienta hasta el punto de ebullición del etanol (78,2°C), el etanol de la mezcla se vaporiza y se separa del otro componente (agua) (Aditiya *et al*, 2016).

Una de las alternativas óptimas para manejar la alta tasa de residuos agrícolas es producir biocombustibles. Además, el uso de residuos de cultivo ayuda a reducir la deforestación al disminuir nuestra dependencia de la biomasa arbórea forestal. Otra ventaja de utilizar estos residuos es que tienen un período de cosecha corto que los hace más disponibles para la producción de bioetanol (Saini *et al*, 2015).

2.3 Hidrólisis enzimática de la celulosa

La hidrólisis completa de la celulosa a glucosa requiere la acción sinérgica de al menos tres enzimas, que en conjunto reciben el nombre de celulasas (Figura 3). Las **endo-1,4-β-glucanasas** (EGs, EC 3.2.1.4), también llamadas CMCase por el sustrato artificial carboximetilcelulosa (CMC) usado para medir la actividad enzimática, atacan

preferentemente las regiones amorfas e hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -1,4-glucosídicos internos en la cadena de celulosa, proporcionando extremos reductores y no reductores de celooligosacáridos. Las **celobiohidrolasas** o exo-1,4- β -glucanasas avanzan a lo largo de la celulosa e hidrolizan las unidades de celobiosa de los extremos reductores (CBHI, EC 3.2.1.176) y no reductores (CBHII EC 3.2.1.91); actuando en colaboración para degradar la celulosa cristalina. Las **β -glucosidasas** o celobiasas (BGLs, EC 3.2.1.21) hidrolizan celobiosa a glucosa y también escinden unidades de glucosa de celooligosacáridos (Behera *et al.*, 2017). Existe un alto grado de coordinación entre las tres enzimas, como la sinergia exo/endo, exo/exo y endo/BGL, que se requiere para la hidrólisis eficiente de los cristales de celulosa (Bhattacharya *et al.*, 2015).

El proceso de hidrólisis completo se puede dividir en dos etapas: hidrólisis primaria e hidrólisis secundaria. La hidrólisis primaria implica EGs y CBHs y se produce en la superficie del sustrato sólido que libera azúcares solubles en la fase líquida, esta etapa de despolimerización es la etapa limitante de la velocidad para todo el proceso de hidrólisis de la celulosa. La hidrólisis secundaria ocurre en la fase líquida e implica principalmente la hidrólisis de celobiosa a glucosa por BGLs (Binod *et al.*, 2011).

Se investigó la relación optimizada de enzimas celulolíticas y se encontró que la mejor sacarificación de celulosa cristalina se logra con una mezcla enzimática (60:20:20 CBH I-CBH II-EG I) y un nivel saturado de BGLs para eliminar la inhibición debido a la celobiosa. Aunque tanto las CBHs como las EGs digieren largas cadenas de polisacáridos en fragmentos más pequeños reduciendo el grado de polimerización del sustrato, las CBHs tienen una mayor reactividad sobre la celulosa cristalina y son las principales enzimas responsables de la solubilización de la celulosa (Wang *et al.*, 2012).

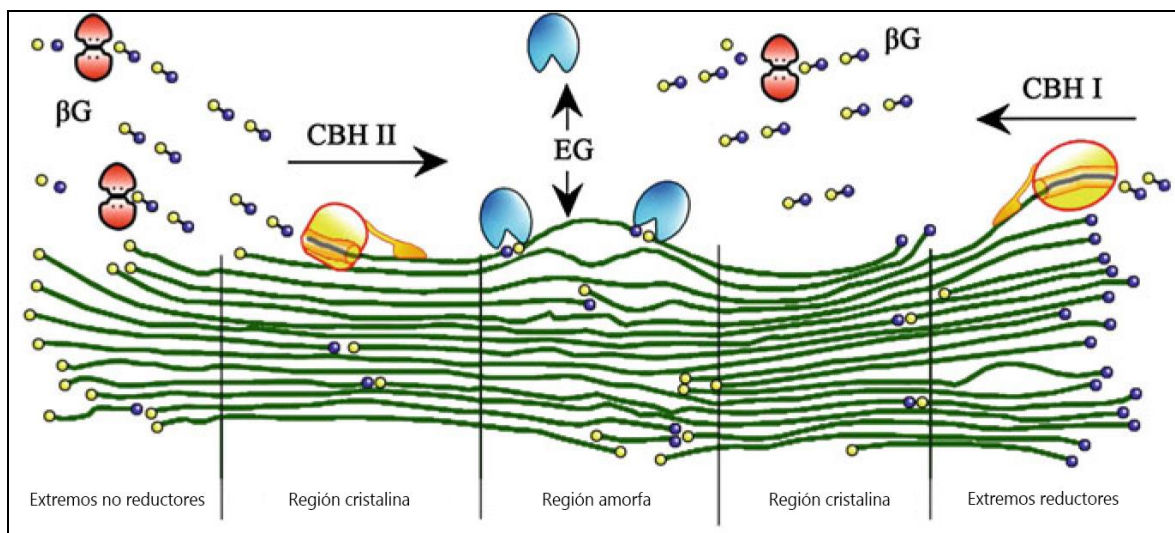


Figura 3: Mecanismo de acción de las enzimas celulasas en la hidrólisis de la celulosa. BG: β-glucosidasas; EG: Endoglucanasas; CBHI: Celobiohidrolasa I; CBHII: Celobiohidrolasa II (tomado de Wang *et al.* 2012, con modificaciones).

Según el sistema de clasificación CAZy (*Carbohydrate-Active EnZymes database*, enzimas activas sobre carbohidratos, <http://www.cazy.org>), las celulasas se clasifican en familias de glicosil hidrolasas que hidrolizan oligosacáridos y/o polisacáridos. La mayoría de las celulasas tienen una estructura característica de dos dominios, un dominio catalítico (CD, *catalytic domain*) que es responsable de la reacción de hidrólisis y un dominio de unión a la celulosa (CBD, *cellulose binding domain*) que media la unión de la enzima al sustrato, conectados a través de la región de enlace (bisagra) rica en residuos de serina, treonina y prolina (Figura 4) (Bhattacharya *et al.*, 2015; Singhania *et al.*, 2016). El dominio catalítico contiene el sitio activo. La presencia de CBD es esencial para la degradación de la celulosa cristalina sólida ya que su rol bioquímico es mantener el sitio catalítico de la enzima cerca de la superficie del sustrato (Soliman *et al.*, 2013).

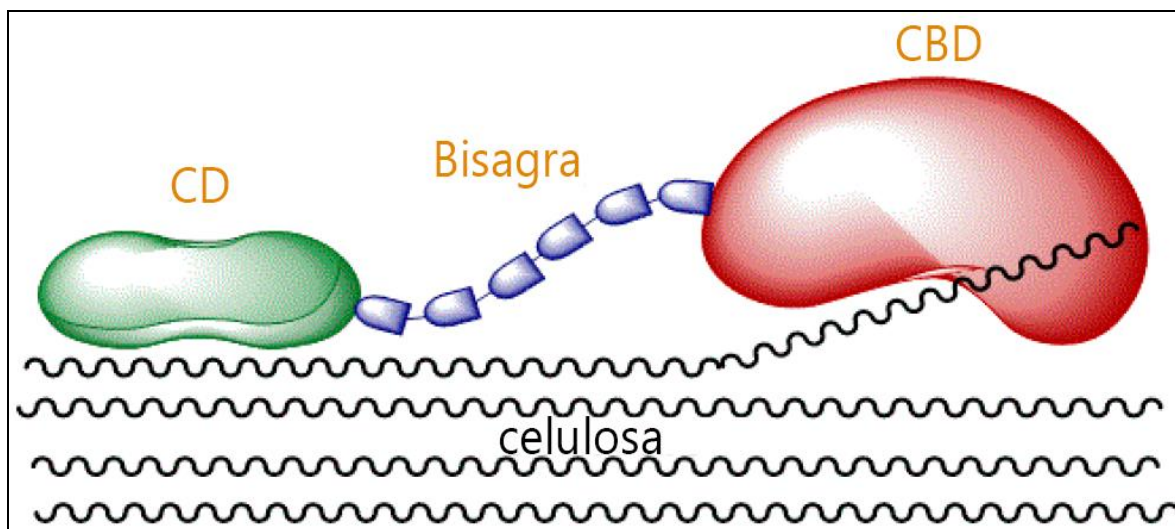


Figura 4: Representación esquemática de la estructura general de las celulasas, consistente en un dominio catalítico (CD) y un dominio de unión a la celulosa (CBD) unidos por una bisagra. (Tomado de Sajith *et al.* 2016 con modificaciones).

Recientemente se han identificado otro tipo de celulasas denominadas celulasas oxidativas, que despolimerizan la celulosa por medio de reacciones de radicales libres. Junto con estas tres celulasas principales, algunas enzimas accesorias tales como las oxidasas líticas actúan junto con las EGs liberando oligómeros con extremos reductores. En el caso de *Streptomyces coelicolor*, la proteína Cbp21 actúa como una enzima oxidativa y ayuda en la despolimerización de la celulosa recalcitrante (Juturu, & Wu, 2014).

La hidrólisis enzimática de la lignocelulosa es un proceso complicado que se ve afectado por muchos factores como la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, el contenido de humedad, la superficie disponible, el contenido de lignina, la concentración de sustrato y las condiciones de reacción (temperatura, pH, y tiempo de incubación) (Hendriks & Zeeman, 2009; Vishwakarma & Banerjee, 2016). Por otra parte, la hidrólisis enzimática de la celulosa implica la degradación de celobiosa a glucosa por las BGLs. Sin embargo, algunos hongos, como *T. reesei* sólo segregan niveles bajos de BGLs, dando como resultado la acumulación de celobiosa durante la hidrólisis, lo que a su vez contribuye a la inhibición de la actividad de CBHs y EGs (Chen *et al.*, 2010). Junto con esto, la dosificación enzimática y su eficacia para la sacarificación también tienen una gran

influencia en la digestibilidad de la biomasa. Aunque el impacto individual de estos factores en la determinación de la eficiencia de la hidrólisis enzimática no se ha resuelto completamente, muchos de estos factores se encuentran interrelacionados durante el proceso de sacarificación (Binod *et al*, 2011).

2.4 Organismos degradadores de la lignocelulosa

El éxito de la producción de etanol lignocelulósico depende de la capacidad para generar un sistema de celulasas eficiente. Por lo tanto, la identificación de un organismo potente productor de celulasas es la clave para el éxito de cualquier tecnología que involucre celulasas (Singhania *et al*, 2016). Las celulasas son generalmente producidas por una amplia variedad de organismos incluyendo bacterias, hongos y actinomicetos, pero los organismos predominantemente responsables de la degradación de la lignocelulosa son los hongos saprofiticos que crecen en materias orgánicas muertas y en descomposición. Muchos hongos son capaces de crecer en la celulosa como la única fuente de carbono, incluyendo los que normalmente se encuentran en la madera. Los hongos se clasifican por el tipo de degradación a saber, hongos de pudrición parda, hongos de pudrición blanda y hongos de pudrición blanca (Soliman *et al*, 2013; Manavalan *et al*, 2015).

Los hongos de pudrición parda representan solamente el 6 % de los hongos de pudrición de la madera y son capaces de degradar la celulosa y las hemicelulosas dejando la lignina más o menos intacta en forma de estructuras marrones en la superficie de la madera, a menudo agrietadas y en forma de ladrillos apilados. El mecanismo de degradación de la celulosa y las hemicelulosas está basado en la producción extracelular de radicales OH altamente reactivos durante reacciones de Fenton. Los hongos de pudrición blanda pertenecen al phylum Ascomycota; comparados con los hongos de pudrición blanca y parda, no son descomponedores agresivos y no son buenos competidores en condiciones normales. Los hongos de pudrición blanda descomponen la celulosa y las hemicelulosas con efecto escaso o nulo sobre la lignina, produciendo típicas cadenas de cavidades en la pared celular. Los hongos de pudrición blanca son los únicos

organismos capaces de degradar la lignina y los carbohidratos de la madera debido a que poseen un consorcio de enzimas lignocelulolíticas. El término de pudrición blanca se debe al residuo blanquecino que queda luego de la degradación completa de la lignina, que se produce antes o al mismo tiempo que la degradación de la celulosa y las hemicelulosas. (Karaman *et al.*, 2012).

La detección y aislamiento de los organismos productores de celulasas en la naturaleza es una de las principales maneras de obtener nuevas celulasas con diversas propiedades. Generalmente, los organismos productores de celulasas son aislados de reservas forestales y naturales. Los organismos que poseen condiciones tales como altos niveles de expresión y secreción de celulasas, capacidad de secretar el espectro completo de celulasas que llevan a la despolimerización completa de celulosa dando altas concentraciones de azúcares y producción de celulasas resistentes a procesos industriales son deseables y han sido patentadas o incluso introducidas en aplicaciones industriales (Juturu & Wu, 2014).

2.5 Políporos de pudrición blanca del clado trametoide

Los Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) constituyen uno de los grupos de hongos más conspicuos de los bosques en todas partes del mundo (Rajchenberg, 2006) y son los encargados de la pudrición blanca de la madera en el 96 % de los casos (Martinez-Anaya *et al.*, 2008).

El clado trametoide, llamado genéricamente *Trametes* engloba hongos Políporos de pudrición blanca ampliamente distribuidos en varios biotopos y ha sido objeto de muchas investigaciones fisiológicas y bioquímicas. El grupo se caracteriza por un basidiocarpo piloso, himenóforo poroide, sistema de hifas generalmente trimítico, basidiosporas lisas negativas con el reactivo de Melzer y ausencia de verdaderos cistidios himeniales. Dentro de este grupo, la única característica morfológica que diferencia a *Pycnoporus* de *Trametes* es el color rojo-anaranjado brillante del basidiocarpo, mientras que otros caracteres morfológicos y bioquímicos no difieren (Tomšovský *et al.*, 2006) por lo que es considerado sinónimo de *Trametes*. El número actual de especies que pertenecen a *Trametes* es de 18

especies reportadas de América del Norte, 9 en Europa y 20 especies en el Neotrópico, estimándose la diversidad global del género en 50 especies (Justo & Hibbett, 2011). *Trametes* fue establecido como un género representativo de *Polyporaceae* por Fries en 1835. Este género está ampliamente distribuido en la naturaleza y algunas especies se han utilizado en la medicina tradicional china. Sin embargo, es difícil identificar muchas especies de *Trametes* y sus géneros relacionados debido a sus características morfológicas muy similares (Cui *et al.*, 2011). En este sentido, el uso de marcadores moleculares es de gran utilidad.

La región espaciadora transcrita interna (ITS, *internal transcribed spacer*) de ADN_r, accesible con cebadores universales, puede distinguir adecuadamente entre la mayoría de las especies fúngicas y es también el marcador fúngico más abundante en las bases de datos públicas (Vetrovský *et al.*, 2016). Sin embargo, el uso de filogenias basadas en secuencias de un solo marcador está actualmente desacreditado, especialmente en lo que se refiere al uso de ITS, ya que se ha demostrado que algunos hongos y plantas contienen copias parálogas. Consecuentemente, el análisis de secuencias combinadas de ITS con genes de una sola copia, tal como el gen que codifica la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (*rpb2*, *second largest subunit of RNA polymerase II*) se ha utilizado con éxito (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002).

2.6 Celulasas fúngicas

Es ampliamente conocido que los hongos producen copiosas cantidades de celulasas. Las CBHs representan casi el 70 % de las proteínas secretadas por los hongos celulolíticos, seguidas de las EGs (~20 %), mientras que las hemicelulasas representan menos del 1 % del peso total de las proteínas secretadas (Sweeney & Xu, 2012). Debido a su abundancia, la comprensión de las estructuras de las CBHs, así como sus mecanismos catalíticos, es indispensable cuando se intenta mejorar la tasa de hidrólisis enzimática de la lignocelulosa (Wang *et al.*, 2012).

Inicialmente, los sistemas celulolíticos que recibieron mayor atención fueron los de organismos productores de grandes cantidades de enzimas, tales como *T. reesei* y *Phanerochaete chrysosporium*. Este último, degrada la celulosa y las hemicelulosas y es uno de los pocos macrohongos que se han utilizado como modelo para el estudio de la degradación de la celulosa. Del análisis de la secuencia de su genoma se han predicho 240 enzimas que actúan sobre carbohidratos, de las cuales 40 son probables EGs, 7 CBHs y 9 BGLs (Martinez-Anaya *et al.*, 2008).

Por su parte, *T. reesei* produce múltiples tipos de celulasas, incluyendo al menos dos CBHs (CBH I/ Cel7A y CBH II/ Cel6A), cinco EGs (EG I/ Cel7B, EG II/ Cel5A, EG III/ Cel12A, EG IV/ Cel61A y EGV / Cel45A) y dos BGLs (BGLI / Cel3A y BGLII / Cel1A), aunque esta última se presenta en bajas cantidades. Se ha demostrado que varias de estas enzimas aparentemente redundantes exhiben sinergia ya sea hidrolizando diferentes extremos de la cadena de celulosa o exhibiendo diferentes afinidades para diferentes sitios de ataque. (Binod *et al.*, 2011).

Las EGs fúngicas son generalmente monómeros con una glicosilación nula o baja, tienen un peso molecular entre 15 y 65 kDa y la mayoría de los pIs son típicamente ácidos en la naturaleza, entre 2 y 6. En su mayoría, tienen un pH óptimo entre 4 y 6 y una temperatura óptima de 45 a 70°C. Al igual que las EGs, las CBHs son monómeros con glicosilación baja o nula, con un peso molecular entre 39 y 65 kDa. Los pIs de las CBHs son ácidos, típicamente entre 3,6 y 4,9. La actividad catalítica óptima de la mayoría de las CBHs tiene lugar a un rango de pH estrecho, entre 4 y 5, mientras que rango de la temperatura óptima es más amplio, entre 37 y 60 °C. Las BGLs son monoméricas, diméricas e incluso triméricas. Las BGLs muestran la mayor variabilidad entre las enzimas celulolíticas debido a su estructura y localización, variando sus pesos moleculares entre 35 y 640 kDa. Además, la mayoría de las BGLs están glicosiladas y en algunos casos, como la BGL monomérica de 300 kDa de *T. versicolor*, el grado de glicosilación es de hasta el 90 %. Las BGLs pueden tener tres localizaciones diferentes, intracelular, asociada a la pared celular y extracelular.

Los valores de pI de las BGLs extracelulares suelen ser ácidos, entre 3,5 y 5,2, sin embargo las BGLs intracelulares poseen valores de pI entre 6,2 y 7. El pH óptimo de estas enzimas varía entre 3,5 y 5,5, mientras que la temperatura óptima oscila entre 45 y 75°C (Dashtban *et al.*, 2009; Manavalan *et al.*, 2015).

La mayoría de las mezclas de celulasas disponibles comercialmente se componen de celulasas y hemicelulasas fúngicas, principalmente a partir del cóctel enzimático producido por *T. reesei*. Actualmente, se plantea la cuestión de qué más se puede hacer para mejorar las enzimas fúngicas o si podría haber una manera de diseñar nuevos cócteles basados en glicosil-hidrolasas fúngicas y bacterianas (Bhattacharya, 2015).

2.7 Investigación sobre la optimización de procesos de producción de celulasas

La investigación sobre la optimización de procesos de producción de celulasas tiene como objetivo mejorar la productividad y la eficiencia de la producción de celulasas (Wang *et al.*, 2012). En este sentido, el principal desafío es identificar los organismos potenciales, la composición de los medios y la optimización de diversos parámetros del proceso que influyen en el crecimiento microbiano y en la producción de enzimas (Sajith *et al.*, 2016).

La mayoría de los estudios sobre la producción de celulasas utilizan la tecnología de fermentación sumergida. El método de fermentación sumergida implica el cultivo de organismos en un medio acuoso rico en nutrientes. Esta metodología implica un gasto considerable en la concentración y extracción de enzimas. Una alternativa es la fermentación en estado sólido, que implica el crecimiento de organismos en materiales sólidos en ausencia de líquido. Sin embargo, las ventajas de un mejor control y manejo aún están asociadas con los cultivos sumergidos. La producción de celulasas en cultivos está asociada con el crecimiento, por lo tanto, está influenciada por diversos parámetros como la naturaleza del sustrato celulósico, el pH del medio y la disponibilidad de nutrientes; una producción a gran escala de celulasas requiere la comprensión y el control adecuado de

las capacidades de producción del crecimiento y de las enzimas del organismo productor (Singhania *et al.*, 2016).

Las celulasas son enzimas inducibles y el suministro del inductor apropiado es el aspecto más problemático y costoso en la producción industrial de las mismas. La producción de enzimas celulolíticas es inducida sólo en presencia del sustrato y reprimida en presencia de azúcares fácilmente utilizables (Sukumaran *et al.*, 2005). La formulación de medios para la fermentación es una preocupación importante porque ninguna composición general puede dar el crecimiento óptimo y la producción de celulasas. La principal limitación técnica en la producción fermentativa de celulasas sigue siendo el aumento de los tiempos de fermentación con baja productividad (Singhania *et al.*, 2016).

Las herramientas estadísticas tales como la metodología de superficie de respuesta (RSM, *Response Surface methodology*) se emplean generalmente para optimizar los parámetros que influyen en una respuesta biológica particular, evaluando críticamente los efectos interactivos normalmente desatendidos en la estrategia de cultivo convencional uno a uno. Además, reduce significativamente el número de experimentos necesarios para la normalización de un proceso biotecnológico con una notable reproducibilidad. Dado que las celulasas son de naturaleza inducible y su producción está influenciada por varios parámetros tales como pH, temperatura, agitación, concentración de sustrato, tipo de nitrógeno, fuente de carbono, etc., se puede emplear eficazmente la RSM para estandarizar estos parámetros del proceso. Por lo tanto, los métodos estadísticos mejoran la eficacia de los procesos de fermentación antes de la industrialización, promoviendo así las utilidades de diversos organismos como fuentes potenciales de bioproductos (Sajith *et al.*, 2016).

2.8. Eficiencia de la hidrólisis

La eficiencia de la acción enzimática en un sustrato puede medirse de muchas maneras diferentes y el método elegido dependerá de los objetivos del estudio. Desde un punto de vista biotecnológico, el objetivo principal es determinar si se ha producido la conversión a

azúcares monómicos y el porcentaje de carbohidratos en el sustrato original que fueron convertidos (Banerjee et al., 2010).

Uno de los principales métodos utilizados para determinar la formación de azúcares reductores es el ensayo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, *3,5-dinitrosalicylic acid*). Este método mide la tasa de actividad de la enzima pero no puede usarse como reflejo preciso del rendimiento ya que no mide la producción de azúcares monómicos, adecuados para la producción de bioetanol (Park *et al.*, 2010). El rendimiento debe determinarse en base a los azúcares monómicos que se forman durante la degradación enzimática, generalmente mediante análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Una vez que se han cuantificado los azúcares, se puede calcular el porcentaje de rendimiento con respecto a la composición original de carbohidratos. Generalmente se evalúa la eficiencia de la hidrólisis en términos de rendimiento de glucosa. Ocasionalmente, también se puede evaluar el rendimiento de otros monómeros como la xilosa (Banerjee et al., 2010). Antes del cálculo del rendimiento, sin embargo, tiene que determinarse la composición del sustrato. Idealmente, el análisis de carbohidratos para determinar el rendimiento debe hacerse sobre el sustrato después del pretratamiento, ya que el pretratamiento puede conducir a la degradación de la fracción de polisacárido de la biomasa (Kumar y Wyman, 2009).

Cabe señalar que para la producción de bioetanol económicamente factible la literatura indica que se requiere un rendimiento de azúcar del 8 % p/p para lograr una concentración final de etanol del 4 % p/p. Para ello, la carga inicial del sustrato debería estar por encima del 20 % p/v, dependiendo del sustrato. Sin embargo, los niveles reales de carga del sustrato requeridos pueden variar dependiendo de la composición de hidratos de carbono y lignina del sustrato (Kristensen *et al.*, 2009). En este sentido, Najafi *et al.* (2016) reportaron que 0,6 Tg de residuos de cebada puede producir 0,21 GL de bioetanol, mostrando que existe un potencial para la utilización de este residuo agrícola en la producción de bioetanol.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo fue obtener un medio enriquecido en CBHs a partir del cultivo de hongos poliporales autóctonos de Misiones (Argentina) con características propicias para su utilización en el proceso de hidrólisis de residuos lignocelulósicos profundizando, a su vez, en el conocimiento de las características bioquímicas y moleculares de dicha proteína.

3.2 Objetivos específicos

De acuerdo al objetivo general planteado se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar y seleccionar hongos poliporales autóctonos de Misiones productores de celulasas enriquecidas en CBHs;
2. Identificar la cepa seleccionada;
3. Analizar el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de la enzima CBH en cultivo líquido, optimizando específicamente la producción de CBHs por parte del hongo seleccionado;
4. Determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad CBH y su estabilidad en el sobrenadante de cultivo;
5. Analizar la eficacia de la sacarificación mediante un micro-ensayo de hidrólisis enzimática sobre residuos de cebada pretratado mecánicamente utilizando el sobrenadante de cultivo;
6. Caracterizar las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Selección de Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) aislados de Misiones productoras de celulasas

4.1.1 Organismos utilizados

Los Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) se aislaron en parques y zonas naturales de Misiones. Ocho de ellos se identificaron previamente como *Trametes* (LBM 002, LBM 010, LBM 017, LBM 018, LBM 029, LBM 030, LBM 031, LBM 033) y seis como *Pycnoporus* (LBM 014, LBM 020, LBM 021, LBM 023, LBM 024, LBM 038). Los aislamientos LBM 002, LBM 010, LBM 014, LBM 017, LBM 018, LBM 020, LBM 021, LBM 023 y LBM 024 fueron aislados y caracterizados por González E. (2013). Los aislamientos LBM 029, LBM 030, LBM 031, LBM 033 fueron provistos por la Facultad de Ciencias Forestales (UNaM) e identificados por Fonseca *et al.* (2016) y el aislamiento LBM 038 fue provisto e identificado por la Universidad Nacional de Buenos Aires. Todos los aislamientos fueron depositados en la colección del laboratorio de biotecnología molecular, Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis) "María Ebe Reca", Universidad Nacional de Misiones (UNaM) y se mantuvieron mediante siembras periódicas en placas de Petri de 6 cm de diámetro y tubos de 1,5 ml y de 15 ml conteniendo medio MEA (extracto de malta 12, 7 g/l, agar 15 g/l), incubadas a 28°C en forma estática el tiempo necesario para su desarrollo y conservadas a 4°C.

4.1.2 Screening de aislamientos productores de celulasas en medios sólidos

Los hongos fueron reactivados en medio sólido MEA e incubados a 28°C por 5 días. Al cabo de este periodo, se cortaron asépticamente tacos de agar cubiertos de micelio joven (5 mm²) y fueron transferidos al centro de las placas en los diferentes ensayos cualitativos.

Para determinar cualitativamente la actividad EG, se realizó un *screening* en placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo medio agar-Czapek (NaNO₃ 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, KCl 0,5 g/l, MgSO₄ 7H₂O 0,5 g/l, FeSO₄·7H₂O 0,01 g/l, agar 20 g/l) suplementado con CMC 0,1 % p/v. El pH del medio se ajustó a 4,5 con ácido acético glacial 100 %. Las

placas fueron inoculadas con tacos correspondientes a cada cepa e incubadas durante 4 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Al finalizar este período, se midió el diámetro de la colonia con un calibre y las placas se incubaron a 50°C en estufa durante 1 h. Posteriormente, se tiñeron con Rojo Congo 0,1 % p/v, se incubaron a 80 rpm durante 15 min y se decoloraron en agua y NaCl 1 M para revelar el halo de degradación, el cual también se midió. El índice de eficiencia celulolítica (IEC) se determinó con la siguiente ecuación:

$$IEC = \frac{hd}{dc}$$

Donde, hd: halo de degradación; dc: diámetro de la colonia.

El *screening* cualitativo de hongos productores de BGLs se llevó a cabo en placas de agar conteniendo 4-Metilumbeliferil glucósido 0,1 mM (Mu-g, Sigma, MO, EE.UU.), CMC 0,1 % p/v y extracto de levadura 0,1 % p/v a pH 4,5 inoculadas con tacos cubiertos de micelio de cada aislamiento correspondiente. El sustrato Mu-g es hidrolizado por la enzima BGL liberando glucosa. El otro producto de la hidrólisis del reactivo, la metilumbeliferona, es fluorescente al ser iluminado por luz ultra violeta (U.V.) Los aislamientos que mostraron fluorescencia después de 5 días de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ se consideraron como positivos. Una placa no inoculada se utilizó como control negativo.

El *screening* cualitativo de hongos productores de CBHs fue llevado a cabo en placas conteniendo 4-metilumbeliferil- β -D-celobiósido 0,1 mM (Mu-c, Sigma, MO, EE.UU.), CMC 0,1 % p/v, extracto de levadura 0,1 % p/v y agar 15 g/l, pH 4,5. El sustrato Mu-c es hidrolizado por la enzima CBH liberando celobiosa. El otro producto de la hidrólisis del reactivo, la metilumbeliferona, es fluorescente al ser iluminado por luz U.V. Los aislamientos que mostraron fluorescencia después de 5 días de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ se consideraron como positivos. Se utilizó medio con Mu-c y sin crecimiento (datos no mostrados) y medio sin Mu-c y con crecimiento como controles.

4.1.3 Condiciones de cultivo para el ensayo cuantitativo

Con el propósito de aportar información cuantitativa acerca de la actividad celulolítica, los aislamientos seleccionados fueron reactivados en medio sólido MEA

durante 5 días. A partir de estos cultivos se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro que se inocularon en frascos Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio líquido Czapek, suplementado con peptona 2 g/l y celulosa cristalina 1 % p/v pH 4,5. Los mismos crecieron a 80 rpm a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y se extrajeron alícuotas de sobrenadante cada cuatro días durante un período de 32 días.

El sobrenadante obtenido se centrifugó a 10.000 g por 15 min a 4°C y se utilizó para cuantificar las actividades EG, BGL y CBH según se detalla en el apartado 4.1.4.

4.1.4 Medición de las actividades enzimáticas

La actividad EG se determinó como la liberación de azúcares reductores mediante la técnica del DNS según Ghose (1987). La mezcla de reacción, conteniendo 100 μl de CMC 2 % p/v en solución tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 y 100 μl del sobrenadante, se incubó por 30 min a 50°C , luego se agregaron 600 μl de DNS a la mezcla de reacción, se hirvió por 5 min y se adicionaron 4 ml de agua destilada. La absorbancia se midió a 540 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por min.

La actividad BGL se determinó según Alfonsel Jaén *et al.* (1986). La mezcla de reacción, conteniendo 900 μl de P-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 1mM (PNPG, Sigma, MO, EE.UU.) en solución tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 y 100 μl del sobrenadante, se incubó a 50°C y 170 rpm por 15 min. La cantidad de p-nitrofenol liberada fue medida como la absorbancia a 400 nm luego de la adición de 0,5 ml de Na_2CO_3 1M a la mezcla de reacción. Una U se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p -nitrofenol por min.

La actividad CBH se determinó según Wu *et al.* (2006), con modificaciones. La mezcla de reacción, conteniendo 800 μl de P-nitrofenil- β -celobiosido 500 μM (PNPC, Sigma, MO, EE.UU.) en solución tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 y 200 μl del sobrenadante, se incubó a 50°C por 30 min. La cantidad de p-nitrofenol liberada se midió como la absorbancia a 405 nm luego de la adición de 1 ml de Na_2CO_3 20 % p/v a la mezcla de reacción. Una U se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p -nitrofenol por min.

4.1.5 Análisis estadísticos

El análisis de ANOVA seguido por el test de Bonferroni se realizó utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism versión 5.01.

4.1.6 Detección de isoenzimas de CBH y EG en ND-PAGE (zimogramas)

La existencia de isoenzimas se determinó mediante electroforesis no desnaturizante (ND-PAGE, *non denaturing -polyacrylamide gel electrophoresis*) en geles de poliacrilamida al 7,5 % p/v (Laemmli, 1979). Para evaluar el perfil isoenzimático de CBHs y EGs se incorporó respectivamente celulosa cristalina 2 % y CMC 2 % p/v al gel de separación. Se sembraron 5 mU/l de muestra en tampón de carga (Tris-HCl 0,5M pH 6,8; glicerol 10 %; Azul de bromofenol 0,05 %) por carril. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en tampón Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3. Los geles se fijaron en una solución conteniendo metanol: ácido acético: agua (4:1:5). Luego, fueron incubados a 50°C por 30 min en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8, coloreados con Rojo Congo 0,1 % p/v por 30 min en agitación y desteñidos con agua corriente y NaCl 1 M. Las bandas se visualizaron claras sobre un fondo oscuro.

4.1.7 Determinación del peso molecular en SDS-PAGE

El peso molecular se determinó mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis*) en geles de poliacrilamida al 7,5 % p/v utilizado un patrón de masa molecular preteñido (Prestained Kaleidoscope SDS-PAGE standard broad range, de BioRad) (Laemmli, 1979). Para evaluar el perfil de CBHs y EGs se incorporó respectivamente celulosa cristalina 2 % y CMC 2% p/v al gel de separación. Se sembraron 5 mU/l de muestra en tampón de carga conteniendo SDS 10 % p/v por carril. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en tampón Tris-Glicina 1,5 M; SDS 1 g/l, pH 8,3. Los geles se fijaron en una solución conteniendo metanol: ácido acético: agua (4:1:5). Luego, fueron incubados a 50°C por 30 min en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8, coloreados con Rojo Congo 0,1 % p/v por 30 min en agitación y desteñidos con agua corriente y NaCl 1 M. Las bandas se visualizaron claras sobre un fondo oscuro.

4.2 Identificación molecular del aislamiento seleccionado

4.2.1 Extracción de ADN

El aislamiento seleccionado se reactivó en placas con medio sólido MEA incubándose durante 5 días a 28°C. Luego, se cortaron asépticamente tacos cubiertos de micelio joven, se colocaron en medio líquido ME conteniendo extracto de malta 12,7 g/l y se incubaron durante 7 días a 28°C. Concluido este período, se extrajo ADN a partir de micelio fúngico utilizando el protocolo propuesto por Fonseca *et al.* (2015). El ADN genómico extraído se conservó en *freezer* a -20°C.

La integridad del ADN extraído se verificó en geles de agarosa al 1 % según se describe en la sección 4.2.4.

La cuantificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 µg/µl de ADN.

4.2.2 Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2

Los cebadores universales para la amplificación de las regiones ITS del ADNr son adecuados y ampliamente utilizados para la identificación taxonómica de los hongos (Vetrovský *et al.*, 2015). Se utilizaron los cebadores universales ITS 1: 5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3' e ITS 4: 5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3' para la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 (White *et al.*, 1990).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) se llevó a cabo utilizando los cebadores universales descriptos y una reacción estándar realizada en un volumen de 20 µl conteniendo tampón PCR (5 mM KCl y 10 mM Tris-HCl pH 8,4), 200 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 10 pmol por reacción de cada cebador, 0,5 U de Taq polimerasa y 50 ng de ADN. El ciclado consistió en una etapa inicial de 4 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 40 s, 50°C por 40 s y 72°C por 40 s y una etapa final de 10 min a 72°C.

Los resultados de los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa al 2 % p/v según se describe en la sección 4.2.4.

4.2.3 Amplificación de la región rpb2

La región entre los dominios conservados 6 y 7 de *rpb2* se amplificó y se secuenció utilizando los cebadores degenerados brpb2-6F: 5' TGG GGY ATG GTN TGY CCY GC 3' y brpb2-7.1R 5' CCC ATR GCY TGY TTM CCC ATD GC 3' (Matheny, 2005). La PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores descritos y una reacción estándar realizada en un volumen de 20 µl conteniendo tampón PCR (5 mM KCl y 10 mM Tris-HCl pH 8,4), 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol por reacción de cada cebador, 0,5 U de Taq polimerasa y 50 ng de ADN. El ciclado consistió en una etapa inicial de 3 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de 94°C por 40 s, 55°C por 40 s y 72°C por 40 s y una etapa final de 15 min a 72°C.

Los resultados de los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa al 2 % p/v según se describe en la sección 4.2.4.

4.2.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon en solución tampón TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5 X realizándose la electroforesis a 120 V por 30 min en TBE 0,5 X. Los geles fueron teñidos con Gel Red (Biotium, 10000X) siguiendo las instrucciones del fabricante, visualizados bajo luz U.V. y fotografiados con cámara digital Canon Power Shot G10.

4.2.5 Secuenciación de los fragmentos obtenidos y análisis bioinformáticos

La secuenciación de los productos de PCR, se realizó por el servicio de secuenciación automática de MACROGEN, Corea. Los análisis bioinformáticos se realizaron con la herramienta BLASTn disponible en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la herramienta de alineamiento de secuencias por pares (*Pairwise sequence alignment*) de la base de datos Fungal Barcoding Database.

4.2.6 Construcción de árboles

Con el fin de construir los árboles además de contar con las secuencias obtenidas para el organismo LBM 033, se extrajeron secuencias de los marcadores ITS y *rpb2* debidamente referenciadas del banco de datos de genes (*GenBank*) del NCBI, correspondientes a especies del grupo *Trametes* (Tabla1). El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante el algoritmo ClustalW del paquete MEGA versión 6. Los árboles se construyeron por los métodos estadísticos del vecino más cercano (NJ: *Neighbor Joining*) usando el modelo de sustitución Kimura-dos parámetros y de máxima parsimonia (MP: *Maximum Parsimony*) utilizando el test de *Bootstrap* con 1000 replicaciones en ambos casos. Para el enraizamiento de los árboles, se utilizó como grupo externo la secuencia ITS1-5,8S-ITS2 (N° de acceso: JN165019.1) y la secuencia del gen *rpb2* (N° de acceso: JN164874.1) del organismo *Lopharia cinerascens*.

Tabla 1: Lista de Taxa, números de acceso de *GenBank* de los marcadores ITS y *rpb2* y las referencias correspondientes utilizados en la identificación del aislamiento seleccionado.

Taxón	Números de acceso (<i>GenBank</i> , NCBI)			
	ITS	Referencia	<i>rpb2</i>	Referencia
<i>P. cinnabarinus</i>	AF363771.1	Lomascolo <i>et al.</i> , 2002		
	FJ234205.1	Lesage-Meessen <i>et al.</i> , 2011		
	AF363772.1	Lomascolo <i>et al.</i> , 2002		
<i>P. sanguineus</i>	AF363771.1	Lomascolo <i>et al.</i> , 2002		
	AJ537498.1	Justo & Hibbett, 2011		
	AF363759.1	Lomascolo <i>et al.</i> , 2002		
	AF363758.1	Lomascolo <i>et al.</i> , 2002		
<i>T. aff. maxima</i>	JN164918.1	Justo & Hibbett, 2011	JN164863.1	Justo & Hibbett, 2011
	JN164933.1	Justo & Hibbett, 2011		
<i>T. betulina</i>	JN164915.1	Justo & Hibbett, 2011	JN164860.1	Justo & Hibbett, 2011
	JN164983.1	Justo & Hibbett, 2011	KF573147.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	GU067734.1	Vasaitis <i>et al.</i> , 2016	JN645126.1	Welti <i>et al.</i> , 2012
			KF573146.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			AB368131.1	Sotome <i>et al.</i> , 2008
<i>T. conchifer</i>	JN164925.1	Justo & Hibbett, 2011	KF573096.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	JN164926.1	Justo & Hibbett, 2011	KF573097.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	JN164924.1	Justo & Hibbett, 2011	KF573098.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573099.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			JN164849.1	Justo & Hibbett, 2011
<i>T. cubensis</i>	JN164922.1	Justo & Hibbett, 2011		
	JN164923.1	Justo & Hibbett, 2011		
	JN164989.1	Justo & Hibbett, 2011		
<i>T. ectypa</i>			JN164848.1	Justo & Hibbett, 2011
			KF573094.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573093.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
<i>T. elegans</i>	HM756194.1	Vlasák & Kout, 2011		
	JN164985.1	Justo & Hibbett, 2011		
	JN164921.1	Justo & Hibbett, 2011		

Continuación Tabla 1

Taxón	Números de acceso (GenBank, NCBI)			
	ITS	Referencia	<i>rpb2</i>	Referencia
<i>T. gibbosa</i>	JN164943.1	Justo & Hibbett, 2011	JN164859.1	Justo & Hibbett, 2011
	AY684176.1	Tomšovský <i>et al.</i> , 2006	AB368173.1	Sotome <i>et al.</i> , 2008
	FJ481048.1	Justo & Hibbett, 2011	JN645110.1	Welti <i>et al.</i> , 2012
<i>T. hirsuta</i>	JF308949.1	Horisawa <i>et al.</i> , 2013	KF573126.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	AB733167.1	Horisawa <i>et al.</i> , 2013	KF573125.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	AB733170.1	Horisawa <i>et al.</i> , 2013	KF573124.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	GU731577.1	Lesage-Meessen <i>et al.</i> , 2011	KF573123.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	HQ435856.1	Malysheva & Zmitrovich, 2011	JN164854.1	Justo & Hibbett, 2011
	EU030183.1	Mathieu <i>et al.</i> , 2013		
	HQ435841.1	Malysheva & Zmitrovich, 2011		
	JN164917.1	Justo & Hibbett, 2011		
	JN164953.1	Justo & Hibbett, 2011		
	KC920740.1	Ogórek <i>et al.</i> , 2017		
<i>T. máxima</i>	JX501305.1	Mathieu <i>et al.</i> , 2013		
	JN164957.1	Justo & Hibbett, 2011	JN164864.1	Justo & Hibbett, 2011
	JN164940.1	Justo & Hibbett, 2011	JN645146.1	Welti <i>et al.</i> , 2012
<i>T. membranacea</i>	JN164932.1	Justo & Hibbett, 2011		
	JN164946.1	Justo & Hibbett, 2011		
	JN164927.1	Justo & Hibbett, 2011		
	JN164956.1	Justo & Hibbett, 2011		
<i>T. ochracea</i>	JN164945.1	Justo & Hibbett, 2011		
			KF573121.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573120.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
<i>T. pavonia</i>			KF573119.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	JN164959.1	Justo & Hibbett, 2011	JN164862.1	Justo & Hibbett, 2011
	JN164958.1	Justo & Hibbett, 2011		
<i>T. pubescens</i>			KF573114.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573118.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573115.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573116.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573117.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
<i>T. suaveolens</i>	FJ810185.1	Justo & Hibbett, 2011	KF573128.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	AY684180.2	Tomšovský <i>et al.</i> , 2006	KR610848.1	Han <i>et al.</i> , 2016
	FJ810176.1	Justo & Hibbett, 2011	JN645131.1	Welti <i>et al.</i> , 2012
			JN164853.1	Justo & Hibbett, 2011
<i>T. versicolor</i>	GU062223.1	Arhipova <i>et al.</i> , 2011	KF573108.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	AM269813.1	Guglielmo <i>et al.</i> , 2007	KF573112.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
	FJ591066.1	Cui <i>et al.</i> , 2011	KF573110.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573109.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
			KF573111.1	Carlson <i>et al.</i> , 2014
<i>T. villosa</i>			JN645124.1	Welti <i>et al.</i> , 2012
	KP872699.1	Ortiz-Monsalve <i>et al.</i> , 2017		
	KF573031.1	Justo & Hibbett, 2011		
	KF573033.1	Justo & Hibbett, 2011		
	KJ417824.1	Gonçalves <i>et al.</i> , 2015		
	JN645101.1	Welti <i>et al.</i> , 2012		
	JN645079.1	Welti <i>et al.</i> , 2012		

4.3 Efecto de los nutrientes sobre la actividad CBH durante el cultivo sumergido del aislamiento seleccionado

4.3.1 Experimento de cribado

Con el fin de determinar el efecto de los nutrientes sobre la actividad CBH del aislamiento seleccionado, se realizó un diseño factorial fraccionado 1/32 con dos puntos centrales bajo un sistema de cultivo sumergido con 20 ml de medio mínimo Czapek en frascos Erlenmeyer de 100 ml a 100 rpm y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 días. Para ello, el cultivo fue suplementado con los nutrientes en la concentración correspondiente según el diseño experimental (Tablas 2 y 3). Entre las fuentes de carbono sintéticas se incluyeron glucosa, celulosa cristalina y CMC; entre los materiales lignocelulósicos, bagazo de caña de azúcar, bagazo de mandioca y aserrín de pino. Las fuentes de nitrógeno evaluadas fueron peptona, sulfato de amonio y extracto de levadura. A su vez, se evaluó el efecto de un surfactante como el tween 80. Cada factor se evaluó a dos niveles, uno inferior (-1) y uno superior (+1). En la Tabla 2 se muestra la decodificación de los niveles para todos los factores. Se realizaron 68 corridas experimentales en dos bloques de acuerdo al diseño planteado, tomando el nivel de actividad CBH como variable de respuesta. Se recolectaron 2 ml de sobrenadante de cultivo cada 6 días durante 24 días a fin de determinar la actividad CBH como se describió en la sección 4.1.4. La matriz experimental del diseño factorial fraccionado 1/32 se realizó con el software Statgraphics Centurion XVII.I. Dicha matriz se detalla en la Tabla 3.

Tabla 2: Factores evaluados en el experimento de cribado. El nivel -1 fue la ausencia del nutriente en todos los casos; se muestra la concentración correspondiente al nivel +1 para cada uno de los nutrientes.

Factores		Niveles	Concentración
Fuentes de carbono sintéticas	Glucosa, celulosa cristalina, CMC	-1	0 g/l
Materiales lignocelulósicos	Bagazo de caña, bagazo de mandioca, aserrín.	+1	10 g/l
Fuentes de nitrógeno	Peptona, sulfato de amonio, extracto de levadura.	-1	0 g/l
		+1	1 g/l
Surfactante	Tween 80	-1	0 ml/l
		+1	1 ml/l

Tabla 3: Matriz experimental del diseño factorial fraccionado 1/32 para determinar los componentes del medio que influyen en los niveles de actividad CBH.

Corrida	Celulosa	Glucosa	CMC	Aserrín	Bagazo de caña	Bagazo de mandioca	Sulfato de amonio	Peptona	Extracto de levadura	Tween
1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
13	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
15	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
17	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
18	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
19	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
20	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
21	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1
22	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1
23	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1
24	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
25	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1
26	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
27	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1
28	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
29	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
30	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
31	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
36	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1
37	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1
38	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
39	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1
40	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
41	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
42	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
43	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
44	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
45	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
46	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
47	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1
48	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
49	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1
50	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
51	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
52	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1

Continuación Tabla 3

Corrida	Celulosa	Glucosa	CMC	Aserrín	Bagazo de caña	Bagazo de mandioca	Sulfato de amonio	Peptona	Extracto de levadura	Tween
53	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
54	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
55	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1
56	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1
57	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1
58	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
59	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1
60	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
61	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1
62	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
63	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
64	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
65	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
66	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los efectos de los componentes nutricionales individuales sobre los niveles de la actividad enzimática se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E_i = \frac{\sum R_{i+} - \sum R_{i-}}{N}$$

Dónde, E_i es el efecto del componente nutricional i bajo estudio, R_{i+} y R_{i-} son las respuestas de la variable dependiente (actividad CBH) de las corridas experimentales, en el cual el componente nutricional estuvo en su nivel superior e inferior, respectivamente y N es el número total de corridas experimentales.

4.3.2 Experimento de superficie-respuesta

En base al análisis estadístico de los resultados del diseño factorial fraccionado $1/32$, se identificaron y seleccionaron los componentes nutricionales cuya adición al medio de cultivo afectó significativamente a la actividad CBH. Para identificar las concentraciones óptimas de los factores seleccionados en el punto 4.3.1 con respecto a la actividad CBH, se llevó a cabo un diseño compuesto central ortogonal 2^2 +estrella con 3 puntos centrales bajo un sistema de cultivo sumergido con 20 ml de medio mínimo Czapek en frascos Erlenmeyer de 100 ml a 100 rpm y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 días. Para ello, el cultivo fue suplementado con los nutrientes en la concentración correspondiente según el diseño experimental (Tablas 4 y 5). Los factores evaluados

fueron celulosa cristalina, peptona y sulfato de amonio a 5 niveles. En la Tabla 4 se muestra la decodificación de cada nivel para todos los nutrientes. Las 17 corridas experimentales del diseño compuesto central ortogonal 2^2 +estrella, realizado con el software Statgraphics Centurion XVII, se detallan en la Tabla 5. Transcurridos los 12 días de incubación, el medio fue filtrado mediante una bomba de vacío y almacenado a -20°C hasta la determinación de la actividad CBH como se describió en la sección 4.1.4.

Tabla 4: Factores evaluados en el experimento de superficie-respuesta. Se muestra la concentración correspondiente a los cinco niveles para cada uno de los nutrientes.

Factores	Niveles	Concentración
Celulosa cristalina	-1,35	8,234 g/l
	-1	10 g/l
	0	15 g/l
	+1	20 g/l
	+1,35	21,766 g/l
Sulfato de amonio y Peptona	-1,35	1,647 g/l
	-1	2 g/l
	0	3 g/l
	+1	4 g/l
	+1,35	4,353 g/l

Tabla 5: Matriz experimental del diseño compuesto central ortogonal 2^2 +estrella.

Corrida	Celulosa	Sulfato de amonio	Peptona
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,35313	0	0
10	1,35313	0	0
11	0	-1,35313	0
12	0	1,35313	0
13	0	0	-1,35313
14	0	0	1,35313
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

El comportamiento del sistema se explicó por la siguiente ecuación del modelo cuadrático:

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ii} x_i^2 + \sum a_{ij} x_i x_j$$

Dónde: y representa la variable de respuesta, a_0 es el coeficiente de intercepción, a_i es el coeficiente del efecto lineal, a_{ii} es el coeficiente de efecto cuadrático y a_{ij} es el coeficiente de efecto de interacción. x_i y x_j denotan los niveles codificados de la variable X_i y X_j en los experimentos.

La variable X_i se codificó como x_i de acuerdo con la siguiente ecuación de transformación:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$$

Dónde, x_i es el valor codificado adimensional de la variable X_i , X_0 es el valor de X_i en el punto central, y ΔX_i es el paso de cambio de la variable.

4.3.3 Validación del modelo estadístico

La validación del modelo estadístico se realizó bajo las condiciones experimentales pre-establecidas por el modelo, maximizando los niveles de actividad CBH detectada en el sobrenadante de cultivo. Para ello, el aislamiento seleccionado se cultivó a 28°C durante 12 días en un medio líquido Czapek conteniendo las concentraciones predichas de los nutrientes. Transcurrido el tiempo de cultivo, el micelio fue filtrado y el sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C para determinar la actividad CBH como se describió en la sección 4.1.4.

Además, el sobrenadante obtenido de esta manera fue utilizado para:

- Evaluar el efecto del pH, la temperatura en la actividad CBH y su estabilidad (apartado 4.4);
- Determinar las actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica y aplicarlo en un micro-ensayo de hidrólisis (apartado 4.5);

- Visualizar e identificar las proteínas expresadas en estas condiciones (apartado 4.6).

4.3.4 Análisis estadísticos

Los diseños experimentales y los análisis estadísticos se realizaron utilizando Stat graphics plus de Windows 5.1.

4.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad CBH y su estabilidad en el sobrenadante de cultivo

En todos los ensayos la actividad CBH fue determinada según se describió en el apartado 4.1.4.

4.4.1 pH óptimo

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad CBH en el sobrenadante de cultivo, las mediciones se realizaron a 50°C variando el pH en el rango de 3 a 10.

Las soluciones tampones utilizadas fueron las siguientes: tampón citrato para pH 3, tampón acetato de sodio para pH 4, 4,8 y 5, tampón fosfato de sodio para pH 6, 7 y 8 y tampón tris-glicina para los pHs 9 y 10. La actividad relativa se expresó como un porcentaje tomando la máxima actividad enzimática como el 100 %.

4.4.2 Temperatura óptima

Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad CBH se realizó una modificación en el protocolo de determinación de la actividad enzimática; la mezcla de reacción fue incubada a pH 4,8 variando la temperatura (4, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 y 80°C) y manteniendo constantes las demás condiciones. La actividad relativa se expresó en porcentaje tomando la máxima actividad enzimática como el 100 %.

4.4.3 Estabilidad en pH

Para determinar la estabilidad enzimática en función del pH, el sobrenadante se incubó a diferentes pHs (3, 4,8, y 7) a una temperatura constante de 50°C durante

diferentes intervalos de tiempo luego del cual se determinó la actividad CBH. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.4.4 Estabilidad en temperatura

Para evaluar la termoestabilidad enzimática en el tiempo, el sobrenadante fue incubado a pH 4,8 y a 30° C, 50° C, 60° C y 70° C. A diferentes intervalos de tiempo, se retiró el sobrenadante y se midió la actividad CBH. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.4.5 Análisis estadísticos

El método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, *Least Significant Difference*) de Fisher y se realizó utilizando Stat graphics plus de Windows 5.1.

4.5 Micro-ensayos de hidrólisis enzimática sobre residuos de cebada

4.5.1 Biomasa utilizada

El residuo de cebada pretratado mediante técnicas de extrusión fue caracterizado y gentilmente proporcionado por el Laboratorio de Energía, Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

La composición del residuo de cebada fue:

Glucanos.....	34,5 %
Hemicelulosas.....	27,79 %
Lignina insoluble.....	17, 22 %
Lignina soluble.....	2,45 %

Cenizas.....11, 89%

4.5.2 Determinación de las actividades enzimáticas hidrolíticas en el sobrenadante

Para que la hidrólisis del material sea efectiva, el sobrenadante aplicado a la biomasa debe presentar actividad sobre los diferentes componentes y formas de la holocelulosa (celulosa + hemicelulosas). Con este propósito, se determinaron las actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de la holocelulosa, a saber, endo- β -1,4-xilanasa, CMCasa (actividad sobre CMC), avicelasa (actividad sobre avicel o celulosa) y actividad sobre celulosa amorfa regenerada (PASC, *Phosphoric Acid Swelling Celulose*).

Las actividades endo- β -1,4-xilanasa, CMCasa, avicelasa y sobre PASC se cuantificaron a partir de la determinación de azúcares reductores mediante el uso del reactivo DNS (Miller, 1959). Para la actividad endo- β -1,4-xilanasa se utilizó como sustrato xilano soluble de madera de Haya (Sigma, MO, EE.UU) 1 % p/v en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8; para la actividad CMCasa se utilizó como sustrato CMC (Sigma, MO, EE.UU.) 2 % p/v en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8; para la actividad avicelasa se utilizó avicel (Sigma, MO, EE.UU) 1 % (p/v) en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 y para la actividad sobre PASC se utilizó avicel (Sigma, MO, EE.UU) modificado según el protocolo de Zhang *et al.* (2006) 1 % (p/v) en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. Las mezclas de reacción (volumen final, 1 ml) estuvieron compuestas del sobrenadante adecuadamente diluido en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 y 500 μ l del sustrato correspondiente. Cada una de las mezclas de reacción se incubó por 60 min a 50°C y 300 rpm. Las reacciones se detuvieron a 100°C por 5 min y se centrifugaron. Se realizaron los controles sustratos correspondientes (sin sobrenadante) y el control extracto enzimático (sin sustrato).

Con el fin de determinar azúcares reductores, 100 μ l de cada sobrenadante se transfirieron a un tubo nuevo y se agregaron 200 μ l de DNS, se incubaron por 5 min a 100°C y 10 min en hielo. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de placas *multiwell*. Una U se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por min. A su vez, el volumen restante de las reacciones (excepto la realizada para determinar actividad avicelasa) se transfirió a otro tubo para analizar los productos de hidrólisis de los diferentes sustratos por HPLC como se describe en la sección 4.5.5.

La actividad sobre papel de filtro (FPasa) se determinó según Ghose (1987). Como sustrato de reacción se utilizó 0,01 g de papel de filtro Whatman N°1 en 0,2 ml de tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 4,8. La mezcla de reacción se incubó 60 min a 50°C. Para la detección de azúcares reductores se utilizó el método colorimétrico con DNS y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm. Una U se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por min.

Los valores se presentaron como las medias de los duplicados \pm el desvío estándar.

4.5.3 Ensayos sobre residuo de cebada

Para evaluar la bioconversión de la biomasa lignocelulósica, se utilizó residuo de cebada pretratado 2 % (p/v) en tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 en una reacción de hidrólisis de un volumen final de 1 ml en tubos Eppendorf de 1,5 ml a 50°C y 200 rpm durante 24 h. El sobrenadante del medio de cultivo estandarizado en 4.3.3 fue concentrado al vacío 5 veces usando un concentrador Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf). Dicho sobrenadante se agregó a la reacción en una carga de 5 FPU (unidades papel filtro)/g biomasa. A su vez, se utilizó una enzima comercial (Novozyme) como control positivo (biomasa + enzima comercial) y se realizaron los correspondientes controles negativos: control sustrato (sin sobrenadante), control sobrenadante o enzima comercial (sin biomasa). A cada tubo se le agregaron 20 μ l de azida de sodio a fin de evitar el crecimiento bacteriano. Todas las reacciones se detuvieron a las 24 h y se centrifugaron durante 20 min. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar azúcares reductores por el método del DNS y analizados por HPLC como se describe en la sección 4.5.5.

Los valores se presentaron como las medias de los triplicados \pm el desvío estándar.

4.5.4 Rendimiento de la hidrólisis

El principal objetivo en la conversión de biomasa es la degradación de los carbohidratos del sustrato en los azúcares monoméricos, particularmente glucosa. Uno de los principales métodos utilizados en la determinación de los azúcares reductores es el ensayo del DNS. A partir de los valores de azúcares reductores se calculó el

porcentaje de sacarificación mediante la siguiente ecuación (Ghose, 1987; Salcedo *et al.*, 2011):

$$\% \text{ sacarificación} = \frac{\text{azúcares reductores} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) * 0,9 * 100}{[S] \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

Donde [S] es la concentración del sustrato.

Aunque el porcentaje de sacarificación arroja una medida aceptable de la tasa de actividad enzimática para los cálculos de sinergia, no indica si están presentes los azúcares monoméricos adecuados para la producción de bioetanol. Para este propósito, el rendimiento debe determinarse en base a los azúcares de los monómeros que se forman durante la degradación enzimática. Esto se lleva a cabo generalmente por HPLC (Van Dyk & Pletschke, 2012). Una vez que los azúcares se han cuantificado, se puede calcular el rendimiento porcentual con respecto a la composición original de carbohidratos. La ecuación para calcular el rendimiento de la hidrólisis es la siguiente:

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\text{glucosa celobiosa o xilosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) * 100}{\text{polisacáridos en el sustrato} * FC}$$

Donde FC corresponde al factor de conversión y es 1,11 para glucosa, 1,05 para celobiosa, y 1,13 para xilosa.

4.5.5 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de los productos de hidrólisis

El análisis HPLC de los productos de hidrólisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 con detector RI y una columna analítica Aminex *HPX-87* con pre-columna (BioRad) a 80 °C por 40 min. La fase móvil consistió en agua 100 % a un flujo de 0,5 ml/min. La concentración de los azúcares (mg/ml) se calculó usando curvas estándar de compuestos puros (Sigma, MO, EE.UU): glucosa, arabinosa, celobiosa, xilosa, xilobiosa y xelotriosa.

4.6 Caracterización de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas

4.6.1 Separación de proteínas totales por SDS-page

El colorante Coomassie Blue Coloidal es utilizado comúnmente para la visualización de proteínas separadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1979). Además, es totalmente compatible con la identificación de proteínas por espectrometría de masas (Dybala & Metzger, 2009). El SDS fue agregado tanto al gel como a los tampones de carga y de corrida. 20 µl del extracto enzimático concentrado, con 2-mercaptoetanol fueron calentadas a 100°C por 5 min y luego sembradas en el gel de poliacrilamida al 10 % p/v. La electroforesis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo a 100 V durante 2 h. Luego, el gel se fijó en una solución conteniendo etanol 30 % v/v y ácido fosfórico 2 % v/v por 3 h, se lavó 3 veces por 30 min con agua destilada y se tiñó con una solución conteniendo metanol 18 % v/v, sulfato de amonio 17 % p/v y ácido fosfórico 2 % v/v durante 1 h, en agitación. Luego, se agregó a la solución teñidora el colorante Coomassie Blue Coloidal G-250 en polvo (Bio-Rad) en una concentración de 0,5 g/l y se agitó suavemente durante un día. Transcurrido el tiempo de incubación, el gel se lavó con agua destilada y las bandas correspondientes a las proteínas se visualizaron en un transiluminador de luz blanca. Para determinar el peso molecular de las bandas se utilizó el marcador de peso molecular Phage Ruler pre-stained protein ladder (Thermo Scientific).

4.6.2 Identificación de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas

Con el fin de identificar las proteínas secretadas en las condiciones optimizadas, el sobrenadante de cultivo fue procesado adecuadamente y enviado para su análisis por espectrometría de masas. Los medios controles contuvieron medio mínimo Czapeck y glucosa en reemplazo de celulosa cristalina como fuente de carbono. Un taco cubierto de micelio joven fue inoculado en los medios controles por duplicado y se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 días a 100 rpm.

4.6.2.1 Preparación de la muestra

La precipitación con ácido tricloroacético (TCA) de proteínas se utiliza comúnmente para concentrar muestras de proteínas o eliminar contaminantes (Koontz, 2014). Para lograr ese objetivo, 45 ml del sobrenadante de cultivo se centrifugó a 10.000 rpm por 20 min, se filtró y se precipitó con 5 ml de TCA durante toda la noche a 4°C. Luego, el

sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 20 min, se retiró el TCA y se realizaron cuatro lavados con acetona 100 % y tres lavados con etanol 100 %, ambos previamente enfriados a -20°C centrifugándose 5 min entre cada lavado. El *pellet* obtenido se resuspendió en 500 µl de agua para HPLC.

A continuación, se midieron las proteínas totales mediante el método del ácido bicinonínico (BSA) utilizando el kit Micro-BSA Protein Assay (Thermo Scientific). La absorbancia fue medida a 562 nm en un lector de placas multiwell y la concentración de proteínas fue expresada en mg/ml en relación a una curva estándar de diluciones seriadas de albúmina.

Luego se redujo, alquiló y precipitó la muestra. Para ello, se agregó ditiotreitól (DTT) 10 mM (concentración final) y se incubó a 56°C durante 45 min. Luego se agregó iodoacetamida 20 mM (concentración final) y se incubó por 40 min en la oscuridad. Por último, se realizó una reprecipitación con TCA de la siguiente manera: a un volumen de la muestra se le agregó 1/5 de volumen de TCA 100 % y se dejó a -20°C durante 2 h. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. El *pellet* obtenido se lavó tres veces con acetona fría, centrifugándose entre lavados a fin de remover el TCA. Para finalizar, se evaporó la acetona residual y se guardó la muestra a -20°C.

Dado que el contenido de proteínas fue elevado para su análisis por espectrometría de masas, se procedió a raspar un trocito del precipitado, el cual fue resuspendido en tampón bicarbonato de amonio 50 mM pH 8 y digerido con tripsina durante toda la noche. Luego, la muestra fue liofilizada por Speed Vac y resuspendida con 10 µl de Ácido Fórmico 0,1 %.

4.6.2.2 Espectrometría de masas

Las muestras fueron enviadas para su análisis por espectrometría de masas al CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos de Espectrometría de Masa), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina.

La muestra se analizó por nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap lo que permitió, en primer lugar, una separación de los péptidos

obtenidos por digestión triptica y una posterior identificación de los mismos. Se utilizó un cromatógrafo marca Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000 apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa Thermo Scientific, modelo: EASY-Spray Accucore (P/N ES801) a 35°C, con pre-columna Thermo Scientific, modelo: Acclaim PepMap (P/N 164946). Se utilizó un gradiente con dos soluciones: solución A (agua con ácido fórmico 0,1 %) y solución B (acetonitrilo con ácido fórmico 0,1 %). A su vez, se utilizó un espectrómetro Thermo Scientific, modelo Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de disociación de alta colisión (HCD, *High Collision Dissociation*) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que estos se separan por cromatografía, obteniendo Full MS y MS/MS. Se utilizó un método que realiza la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo. La duración del ciclo dependió de la resolución utilizada. En cada ciclo el equipo realizó un Full MS y luego MS/MS a los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma.

La ionización de la muestra se realizó por electrospray (Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY), con un voltaje del *spray* de 3,5 kV.

4.6.2.3 Análisis de los datos

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Proteome Discoverer (Thermo Scientific) versión 1,4, utilizando la base de datos correspondiente al estudio en cuestión. El programa desarrolló un informe donde indicó que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación.

Criterios de búsqueda

- Base de datos (origen): *Trametes versicolor*.
- Enzima: tripsina.
- Misleavage: 2.
- Tolerancia de masa para precursor: 10 ppm.
- Tolerancia de masa para fragmento: 0,05 Da.
- Modificaciones Dinámicas: Oxidación (M); Carbamidometilación (C)
- Modificaciones estáticas.

-Nivel de confianza de los péptidos: alto.

4.6.3 Caracterización de las proteínas identificadas

La caracterización de la proteínas identificadas por el servicio espectrometría de masas se realizó con las siguientes bases de datos y programas *on-line*: NCBI, Cazy, Uniprot (the UNIversal PROTein Resource, <http://www.uniprot.org>), Pfam (Protein FAMilies, <http://pfam.xfam.org/>), y SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv_sosui.cgi).

5. RESULTADOS

5.1 Selección de Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) aislados de Misiones productoras de celulasas

Con el fin de seleccionar un aislamiento productor de celulasas para su potencial uso en el proceso de sacarificación se realizaron ensayos de *screening* cualitativos en medios sólidos utilizando colorantes indicativos de la actividad celulolítica seguidos de un ensayo cuantitativo en fermentación sumergida para verificar y valorar la actividad enzimática.

5.1.1 *Screening de aislamientos productores de celulasas en medios sólidos*

Como primer paso en la evaluación del potencial celulolítico de 14 Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) aislados de Misiones se realizaron ensayos en medios sólidos. Para determinar semi-cuantitativamente la actividad EG se utilizaron placas conteniendo CMC cuya degradación se visualizó en las zonas no coloreadas con Rojo Congo. En cambio, las actividades BGL y CBH se determinaron cualitativamente mediante métodos fluorimétricos utilizando los sustratos Mu-g y Mu-c respectivamente.

En el ensayo correspondiente a la actividad EG, todos los aislamientos estudiados produjeron zonas de hidrólisis en las placas de agar-CMC (Figura 5). Sin embargo, el IEC del aislamiento LBM 033 fue mayor a 3, mientras que el IEC de las cepas restantes estuvo cercano a 1, lo cual implicó que los diámetros de crecimiento y de degradación fueron similares en estos aislamientos. Por lo tanto, LBM 033 mostró una mayor actividad sobre CMC con respecto a los otros aislamientos estudiados ($P < 0,001$).

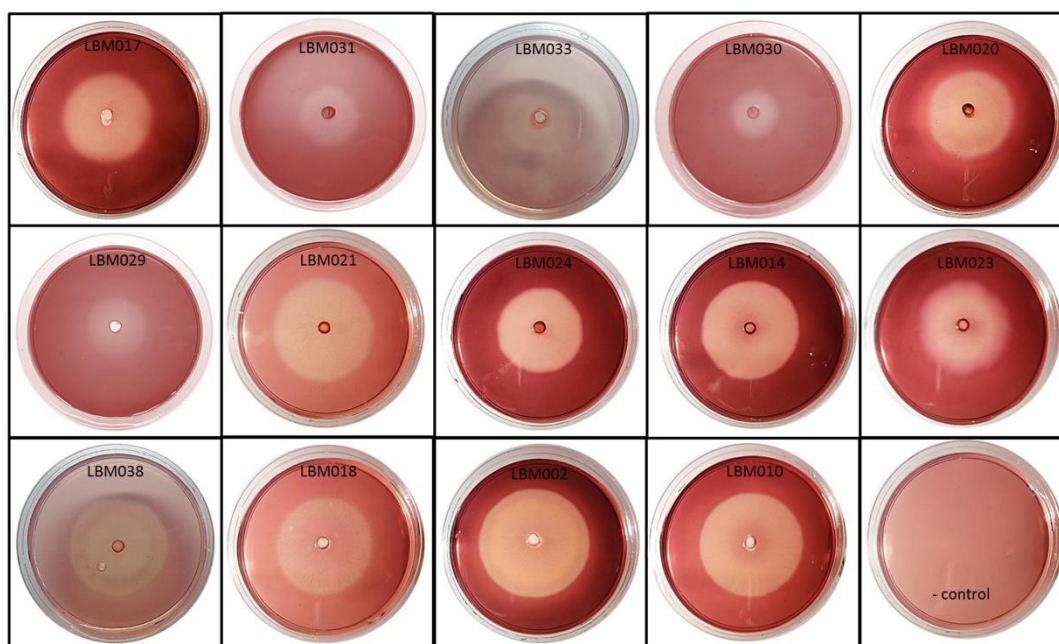


Figura 5: *Screening* de actividad EG en placas CMC-agar. La actividad enzimática fue revelada a los 4 días de crecimiento con Rojo Congo. Los ensayos fueron hechos por duplicado para los 14 aislamientos estudiados. Se utilizó una placa no inoculada como control negativo.

Entre todos los hongos estudiados para la actividad BGL, algunos mostraron un halo de fluorescencia por fuera de la zona de crecimiento (LBM 038, LBM 024), otros mostraron un halo de fluorescencia por dentro de la zona de crecimiento (LBM 033, LBM 030 y LBM 029) y otros mostraron fluorescencia en toda la placa (LBM 017, LBM, 031, LBM 020, LBM 021, LBM 014 y LBM 023). Todas estas reacciones fueron consideradas como positivas. Sin embargo, los aislamientos LBM 002, LBM 010 y LBM 018 mostraron una zona opaca en la mayoría de la placa, con un pequeño halo al borde de la colonia por lo cual su actividad fue considerada incierta (Figura 6).

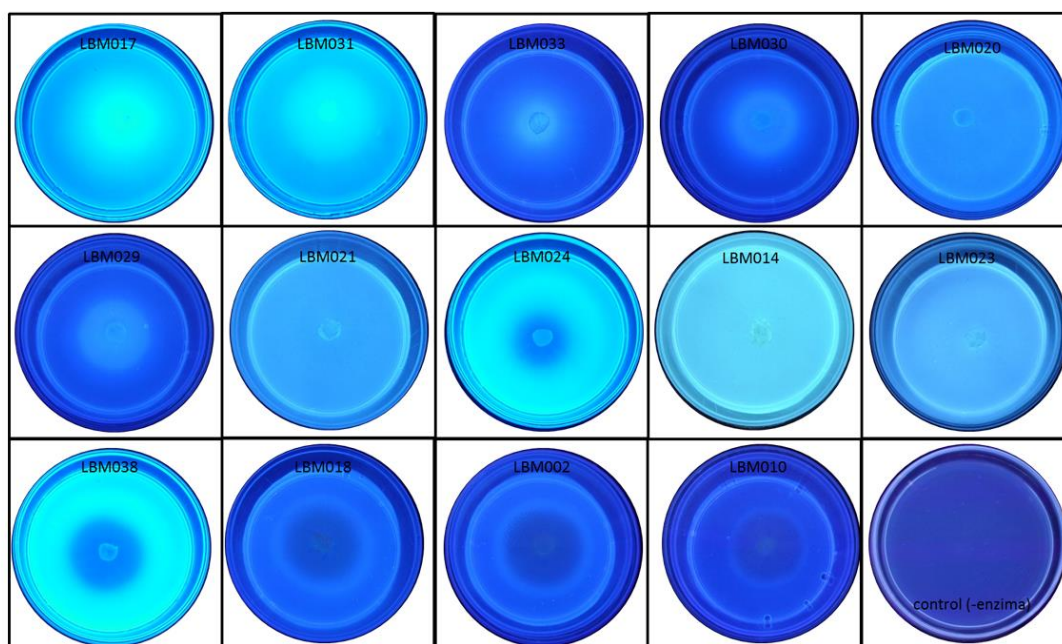


Figura 6: *Screening* de actividad BGL en placas Mu-g-agar a los 5 días de cultivo. Los ensayos fueron hechos por duplicado para los 14 aislamientos estudiados. Se utilizó una placa no inoculada como control negativo.

En el ensayo realizado para detectar la actividad CBH, 11 aislamientos (LBM 014, LBM 017, LBM 020, LBM 021, LBM 023, LBM 024, LBM 029, LBM 030, LBM 031, LBM 033 y LBM 038) presentaron una reacción positiva mostrando fluorescencia en la placa completa cuando se expuso a la luz U.V. Sin embargo, los aislamientos LBM 002, LBM 010 y LBM 018 no mostraron fluorescencia, al igual que los controles negativos, los cuales consistieron en medio agarizado sin sustrato y con crecimiento fúngico (Figura 7).

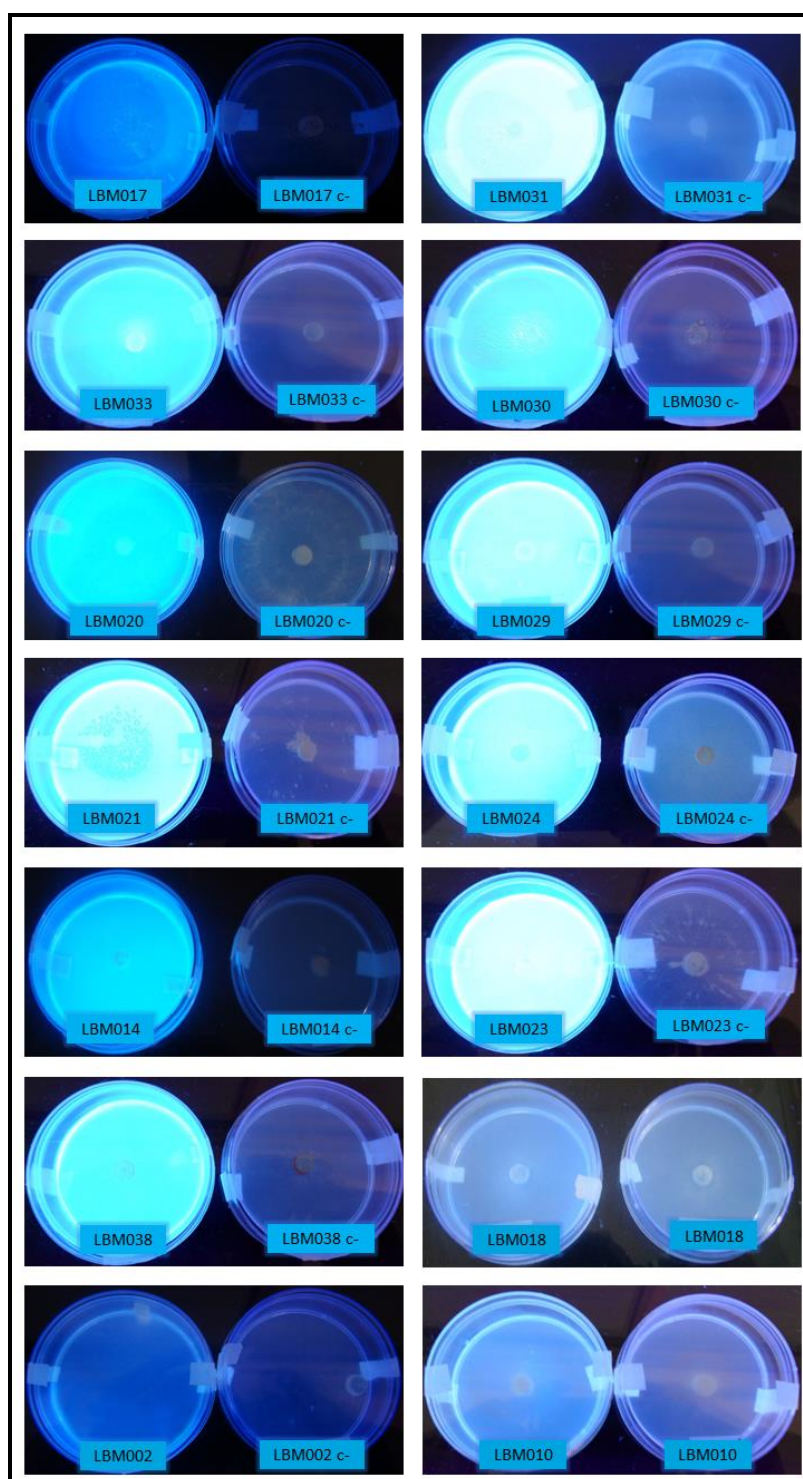


Figura 7: *Screening* de actividad CBH en placas Mu-c-agar a los 5 días de cultivo. Los ensayos fueron hechos por duplicado para los 14 aislamientos estudiados. En cada par de placas, a la izquierda se observa el aislamiento inoculado en un medio con Mu-c y a la derecha, la placa inoculada en un medio sin el sustrato (controles negativos).

Los resultados de estos ensayos se resumen en la tabla 6. Los 11 aislamientos que resultaron positivos para las tres actividades enzimáticas ensayadas cualitativamente

(LBM 014, LBM 017, LBM 020, LBM 021, LBM 023, LBM 024, LBM 029, LBM 030, LBM 031, LBM 033 y LBM 038) se seleccionaron para continuar con el estudio cuantitativo en medio líquido.

Tabla 6: *Screening* en medios sólidos. La actividad EG se determinó semicuantitativamente a los 4 días utilizando el sustrato CMC y coloreando con Rojo Congo. Las actividades BGL y CBH se determinaron cualitativamente utilizando los sustratos Mu-g y Mu-c respectivamente a los 5 días de crecimiento.

Aislamiento	Actividad EG (medias del IEC)	Actividad BGL	Actividad CBH
LBM 002	0,98	+/-	-
LBM 010	0,91	+/-	-
LBM 014	0,98	+	+
LBM 017	1,61	+	+
LBM 018	0,84	+/-	-
LBM 020	0,82	+	+
LBM 021	0,92	+	+
LBM 023	0,84	+	+
LBM 024	0,93	+	+
LBM 029	1,07	+	+
LBM 030	1,10	+	+
LBM 031	1,05	+	+
LBM 033	3,02	+	+
LBM 038	0,94	+	+

*IEC: índice de eficiencia celulolítica.

+: Implica reacción positiva.

-: Implica reacción negativa.

+/-: Implica reacción incierta.

5.1.2 Ensayo cuantitativo de aislamientos productores de celulasas

Los 11 aislamientos seleccionados fueron cultivados en medio líquido Czapeck con celulosa microcristalina como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno y se determinaron las actividades EG, BGL y CBH cada 4 días, a lo largo de los 32 días de cultivo (Figura 8).

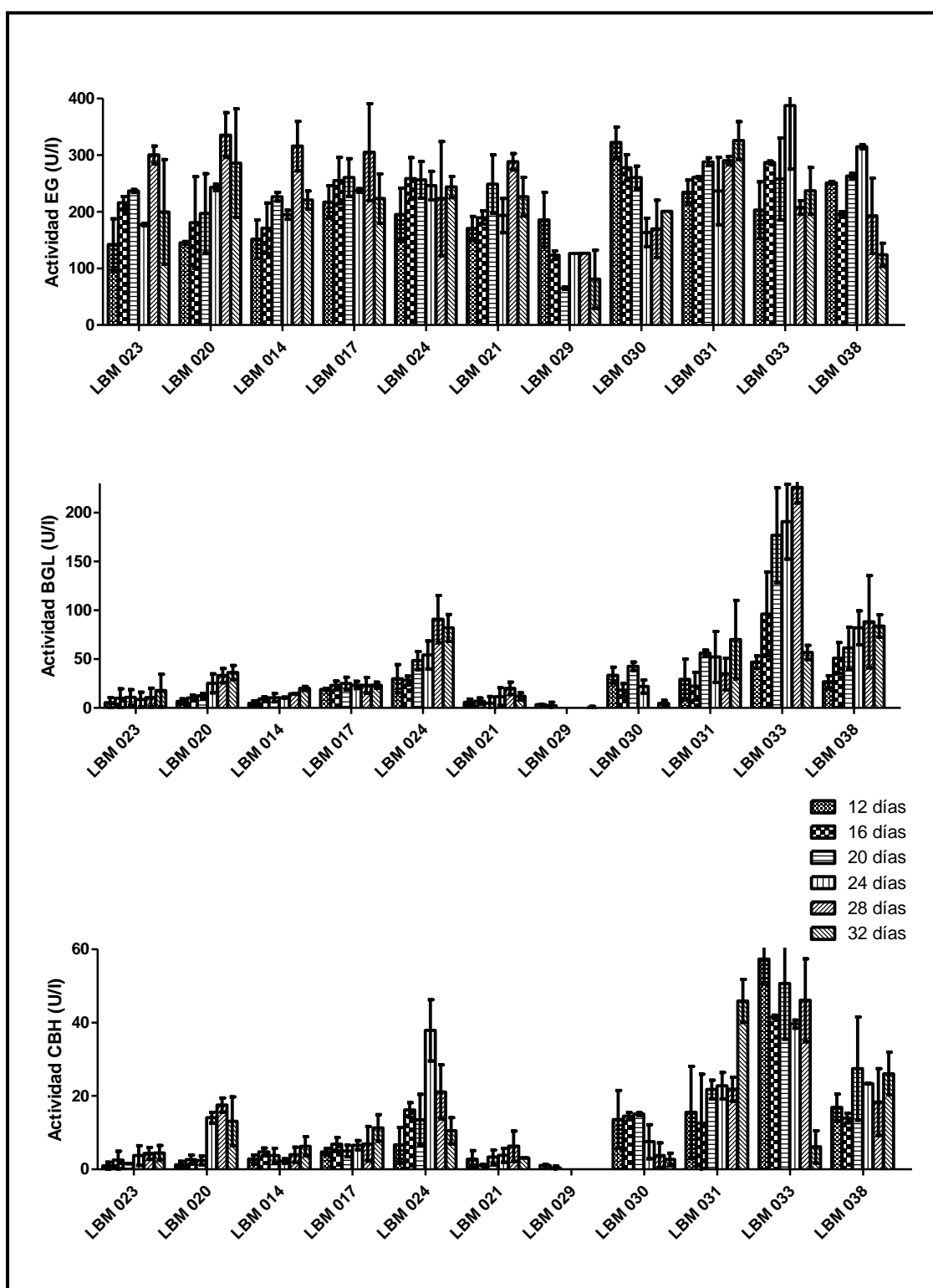


Figura 8: Actividades EG, BGL y CBH correspondientes a los 11 aislamientos seleccionados a los 12, 16, 20, 24, 28 y 32 días de cultivo en medio líquido Czapek suplementado con peptona y celulosa cristalina.

Las actividades EG, BGL y CBH fueron bajas o nulas en todos los aislamientos estudiados en los dos primeros periodos evaluados (4 y 8 días de incubación, datos no mostrados).

En cuanto a la actividad EG, el aislamiento LBM 033, que presentó el mayor IEC cuando se evaluó cualitativamente, fue capaz de producir 387,1 U/l el día 24 de cultivo. Este valor de actividad enzimática y el obtenido para LBM 038 (314,7 U/l) fueron mayores ($P<0,01$) a los determinados para todos los otros aislamientos el mismo día. Otros valores altos de actividad enzimática ($P<0,05$) fueron: 322,1 U/l el día 12 (LBM 030), 355,1 U/l (LBM 020) y 315,7 U/l (LBM 014) a los 28 días y 325,6 U/l a los 32 días (LBM 031), mientras que el valor más bajo observado correspondió al aislamiento LBM 029 (65,1 U/l) al día 20 de cultivo.

En relación a la actividad BGL, LBM 033 mostró valores de actividad enzimática mayores ($P<0,05$) con respecto a todos los otros aislamientos evaluados los días 16, 20, 24 y 28. Los mayores valores de actividad enzimática del aislamiento LBM 033 fueron registrados los días 24 (190,8 U/l) y 28 (226 U/l), decayendo drásticamente el día 32 (56,8 U/l). No fue posible detectar actividad enzimática en la cepa LBM 029 ninguno de los días evaluados.

En cuanto a la actividad CBH, LBM 033 presentó mayor actividad enzimática ($P<0,001$) con respecto a todos los otros aislamientos testeados los días 12 (57,3 U/l), 16 (41,5 U/l), 20 (50,6 U/l) y 28 (46,1 U/l). Sin embargo, la actividad decayó drásticamente el día 32 (6,1 U/l) mientras que el aislamiento LBM 031 alcanzó un valor de 45,9 U/l, significativamente mayor ($P<0,001$). No fue posible detectar actividad enzimática en el aislamiento LBM 029 ninguno de los días evaluados.

5.1.3 Análisis electroforético de CBHs y EGs

El perfil de isoformas de las enzimas EG y CBH se evaluó por ND-PAGE (zimogramas) y SDS-PAGE incorporando CMC y celulosa cristalina respectivamente a los geles separadores. Los análisis correspondientes a la actividad BGL no pudieron realizarse debido a que el máximo valor de actividad enzimática lograda en el cultivo líquido fue

menor al límite de detección de las técnicas electroforéticas descriptas para esta actividad.

5.1.3.1 Perfil isoenzimático de EGs

La Figura 9 muestra el zimograma (A) y el gel desnaturalizante (B) correspondiente a los 11 aislamientos evaluados para la enzima EG el día de mayor actividad de cada aislamiento. El aislamiento LBM 029 no mostró ninguna banda en los geles debido a su baja actividad enzimática, mientras que los restantes 10 aislamientos mostraron zonas de degradación en los geles de poliacrilamida, mostrando para varios aislamientos bandas en el rango de 69-88 kDa de peso molecular.

Entre aquellos aislamientos referidos como *Trametes*, LBM 033 presentó una sola banda, correspondiente a un peso molecular de alrededor de 80 kDa; en el caso de los aislamientos LBM 030 y LBM 031 se logró detectar solamente una banda correspondiente a 69 kDa, mientras que para el aislamiento LBM 017 se observaron 3 isoenzimas de aproximadamente 30, 39 y 69 kDa.

Entre los aislamientos referidos como *Pycnoporus*, LBM 020 y LBM 038 mostraron una banda correspondiente a aproximadamente 88 kDa en el gel con SDS (aunque el aislamiento LBM 020 había mostrado 2 bandas en el zimograma). Cuando el aislamiento LBM 014 fue analizado en el zimograma, se observaron dos bandas, sin embargo, en el gel de poliacrilamida desnaturalizante se vieron 3 bandas correspondientes a isoenzimas de 30, 39 y 88 kDa de peso molecular (patrón similar al observado en el aislamiento LBM 017). Los aislamientos LBM 021, LBM 023 y LBM 024 mostraron un perfil de bandas similar en los geles de poliacrilamida, el cual consistió en una banda correspondiente a 84 kDa en los geles con SDS y de 2 bandas en el gel no desnaturalizante.

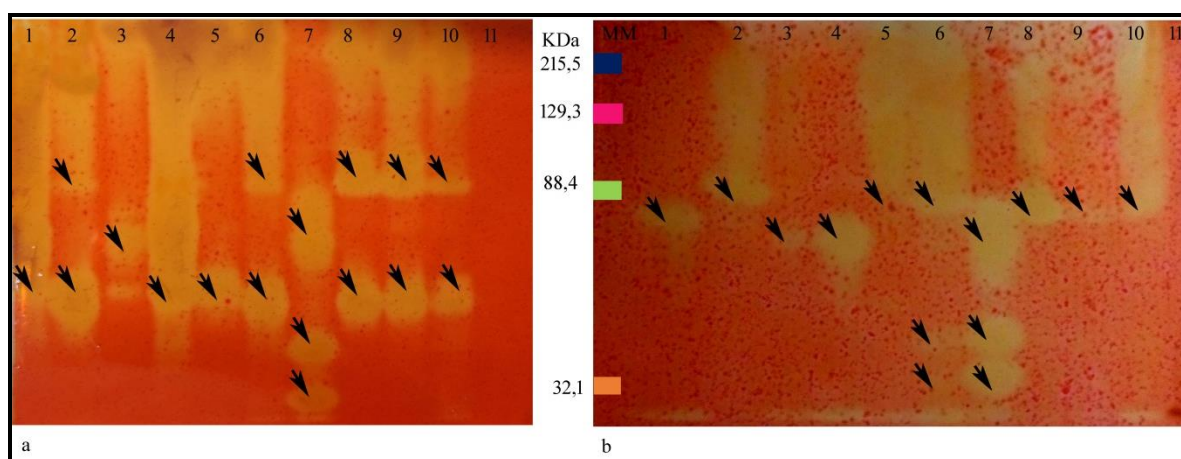


Figura 9: Detección de EGs el día de mayor actividad de cada aislamiento en geles nativos (a) y SDS-PAGE (b). Las bandas fueron detectadas por contraste con la tinción Rojo Congo. Carriles: 1: LBM 033; 2: LBM 020; 3: LBM 030; 4: LB M031; 5: LBM 038; 6: LBM 014; 7: LBM 017; 8: LBM 023; 9: LBM 021; 10: LBM 024; 11: LBM 029; MM: marcador de peso molecular (Kaleidoscope, BioRad).

5.1.3.2 Perfil isoenzimático de CBHs

La Figura 10 muestra el zimograma (A) y el gel desnaturalizante (B) correspondiente a las 11 cepas evaluadas para la enzima CBH.

En el gel no desnaturalizante, la única banda visualizada en los carriles correspondientes a los aislamientos LBM 030 y LBM 038 fueron resueltas en 2 bandas en el gel desnaturalizante, mientras que la banda observada en el carril correspondiente a la cepa LBM 014 fue resuelta en 3 bandas. Todos los aislamientos estudiados, excepto LBM 029 y LBM 033, presentaron una banda correspondiente a 45 kDa. Los aislamientos LBM 030, LBM 031 y LBM 038 mostraron una banda adicional de aproximadamente 36 kDa, mientras que el aislamiento LBM 014 mostró un perfil de bandas consistente en 3 isoenzimas de aproximadamente 36, 45 y 65 kDa.

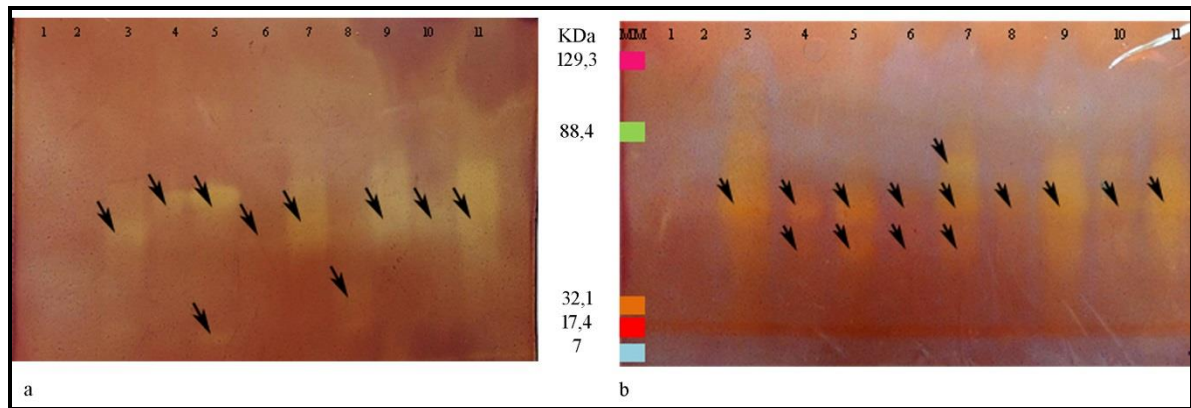


Figura 10: Detección de CBH el día de mayor actividad de cada aislamiento en geles nativos (a) y SDS-PAGE (b). Las bandas fueron detectadas por contraste con la tinción Rojo Congo. Carriles: 1: LBM 029; 2: LBM 033; 3: LBM 020; 4: LBM 030; 5: LBM 031; 6: LBM 038; 7: LBM 014; 8: LBM 017; 9: LBM 023; 10: LBM 021; 11: LBM 024; MM: marcador de peso molecular (Kaleidoscope, BioRad).

5.2 Identificación molecular del aislamiento seleccionado

Entre los hongos xilófagos evaluados, LBM 033 fue seleccionado para continuar con la caracterización por ser el aislamiento que mostró la secreción del complejo celulítico completo en condiciones basales en cantidades biotecnológicamente promisorias. Como primer paso, se logró extraer material genético en buena cantidad y calidad, pudiéndose observar bandas nítidas en geles de agarosa al 1 %, correspondientes al ADN genómico (datos no mostrados). Luego se procedió a la amplificación de dos marcadores moleculares y la construcción de árboles para su identificación.

5.2.1 Amplificación y secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2

Para la amplificación por PCR de la región ITS1-5,8S-ITS2 se utilizaron los cebadores universales ITS 1 e ITS 4 (White *et al.*, 1990). Cuando los productos obtenidos se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2 % p/v, se visualizó una banda única de 600 pares de bases (pb) aproximadamente, la cual fue secuenciada y analizada bioinformáticamente.

Mediante estos análisis, se obtuvo una secuencia de 436 pb, la cual fue depositada en la base de datos *GenBank* del NCBI con el número de acceso KY451901. El

alineamiento por pares de esta secuencia en las bases de datos arrojó un índice de identidad del 99 % con la especie *Trametes villosa* (números de acceso JN645101.1, JN645079.1, KJ417824.1, KF850162.1, KF850161.1 y KF573031.1).

5.2.2 Amplificación y secuenciación de la región comprendida entre los dominios conservados 6 y 7 del gen *rpb2*

Para la amplificación por PCR de la región comprendida entre los dominios conservados 6 y 7 del gen *rpb2* se utilizaron cebadores degenerados (Justo A & Hibbett, 2011). Cuando los productos obtenidos se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2 % p/v, se obtuvo una banda única de 800 pb aproximadamente, que fue secuenciada y analizada bioinformáticamente.

Mediante estos análisis se obtuvo una secuencia de 720 pb del gen *rpb2*, la cual fue depositada en el banco de genes con el número de acceso KY987516. En este caso, el alineamiento arrojó un índice de identidad del 95 % de la secuencia incógnita nuevamente con la especie *T. villosa* (N° de acceso KF573127.1).

5.2.3 Construcción de árboles

Para identificar correctamente el aislamiento LBM 033 se construyeron árboles a partir del alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en este trabajo con secuencias almacenadas en las bases de datos públicas. Las secuencias utilizadas, los códigos de acceso y las referencias correspondientes se detallaron en la sección 4.2.6.

Los árboles consenso resultantes del alineamiento para el marcador ITS mostraron un fuerte posicionamiento del aislamiento LBM 033 con secuencias de *T. villosa* con valores de *bootstrap* de 75 con el método NJ (Figura 11) y de 80 con el método MP (Figura 12), además de reflejar la filogenia propuesta para el grupo (Justo & Hibbett, 2011). Las 57 secuencias correspondientes a las 15 especies se conformaron en 7 grupos. Las secuencias correspondientes a las especies *T. gibbosa*, *T. betulinus*, *T. membranacea* y *T. Pavonia* se agruparon juntas, formando el primer clado (clado Lenzites), el segundo grupo se formó con las especies *T. hirsuta*, *T. villosa* y la secuencia

correspondiente al aislamiento LBM 033. Las especies *T. versicolor*, *T. conchifer* y *T. suaveolens* formaron un tercer grupo. El segundo y el tercer grupo formaron en conjunto el clado Trametes. La especie *T. máxima* se agrupó junto con los aislamientos identificados como *T. aff. máxima* y un quinto grupo se formó solamente con secuencias de la especie *T. elegans*. La especie *T. máxima*, junto con *T. aff. máxima* y *T. elegans* conformaron el clado Artolenzites. Las especies de *Pycnoporus* se agruparon juntas, separadas de la especie *T. cubensis*, con la cual formaron el clado Pycnoporus.

Para el marcador *rpb2*, los árboles consenso mostraron un agrupamiento fuerte del aislamiento LBM 033 con la única secuencia disponible de *T. villosa* en la base de datos para este marcador, con valores de *bootstrap* de 66 con el método NJ (Figura 13) y de 58 con el método MP (Figura 14). Además, las 55 secuencias correspondientes a las 13 especies se agruparon en 3 clados reflejando también la filogenia propuesta para el grupo: las especies *T. ectypa*, *T. versicolor*, *T. pubescens*, *T. conchifer*, *T. ochracea*, *T. suaveolens*, *T. villosa* y *T. hirsuta* se agruparon juntas formando el clado Trametes. Las especies *T. pavonia*, *gibbosa* y *betulinus* formaron otro grupo, correspondiente al clado Lenzites, mientras que las secuencias de *T. máxima* y *T. aff. máxima* conformaron un grupo separado, correspondiente al clado Artolenzites.

En base a los resultados obtenidos con los alineamientos de las secuencias de la región ITS1-5,8S-ITS2 y la región comprendida entre los dominios conservados 6 y 7 del gen *rpb2* del aislamiento LBM 033, los cuales mostraron un alto nivel de identidad con secuencias válidamente publicadas y su agrupamiento en los respectivos árboles, el hongo fue identificado como *T. villosa*.

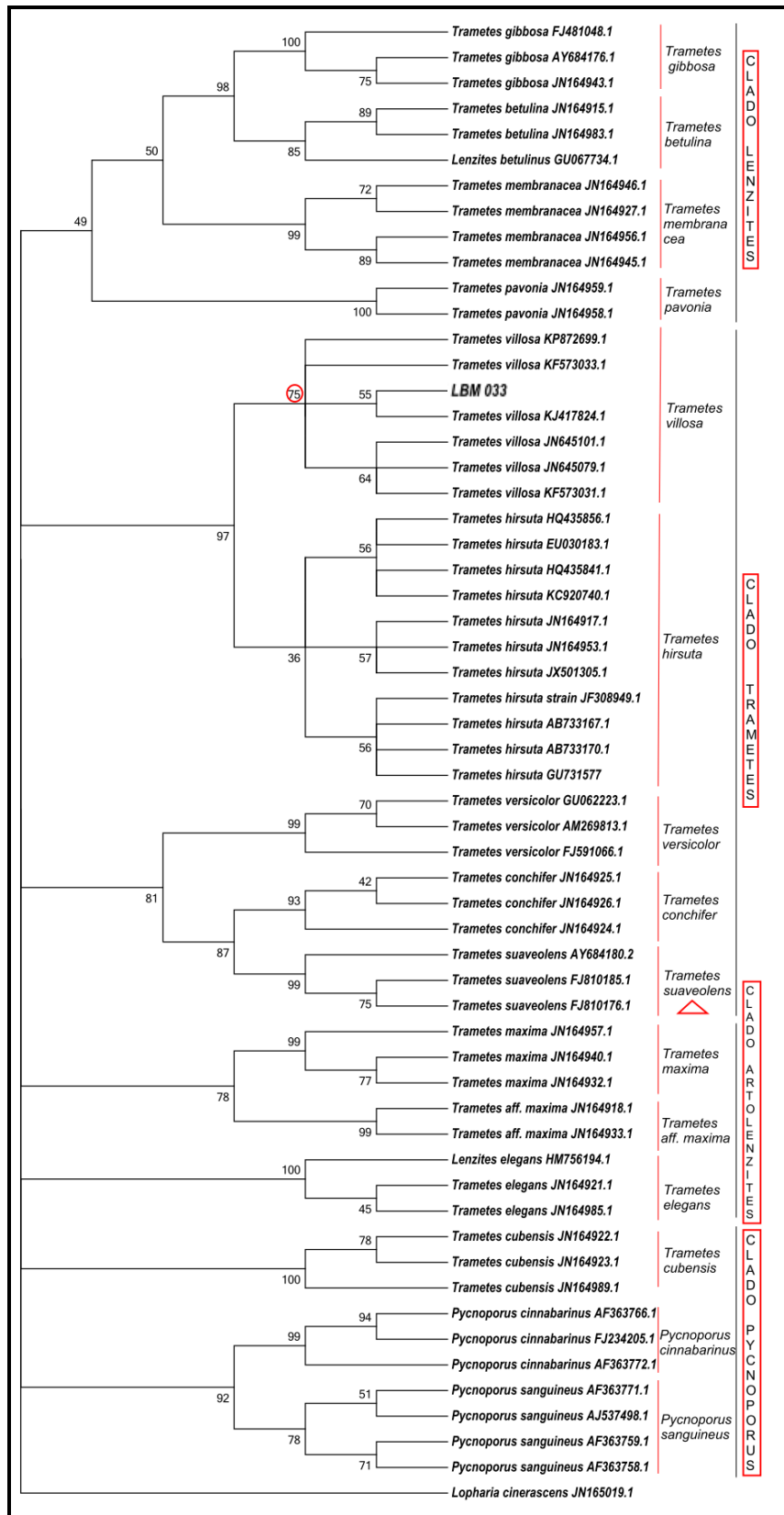


Figura 11: Árbol realizado por el método NJ, basado en el alineamiento de la secuencia de ADN_r ITS del hongo en estudio con secuencias obtenidas del *GenBank* (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de *bootstrap* de interés. El triángulo representa la especie tipo de *Trametes*.

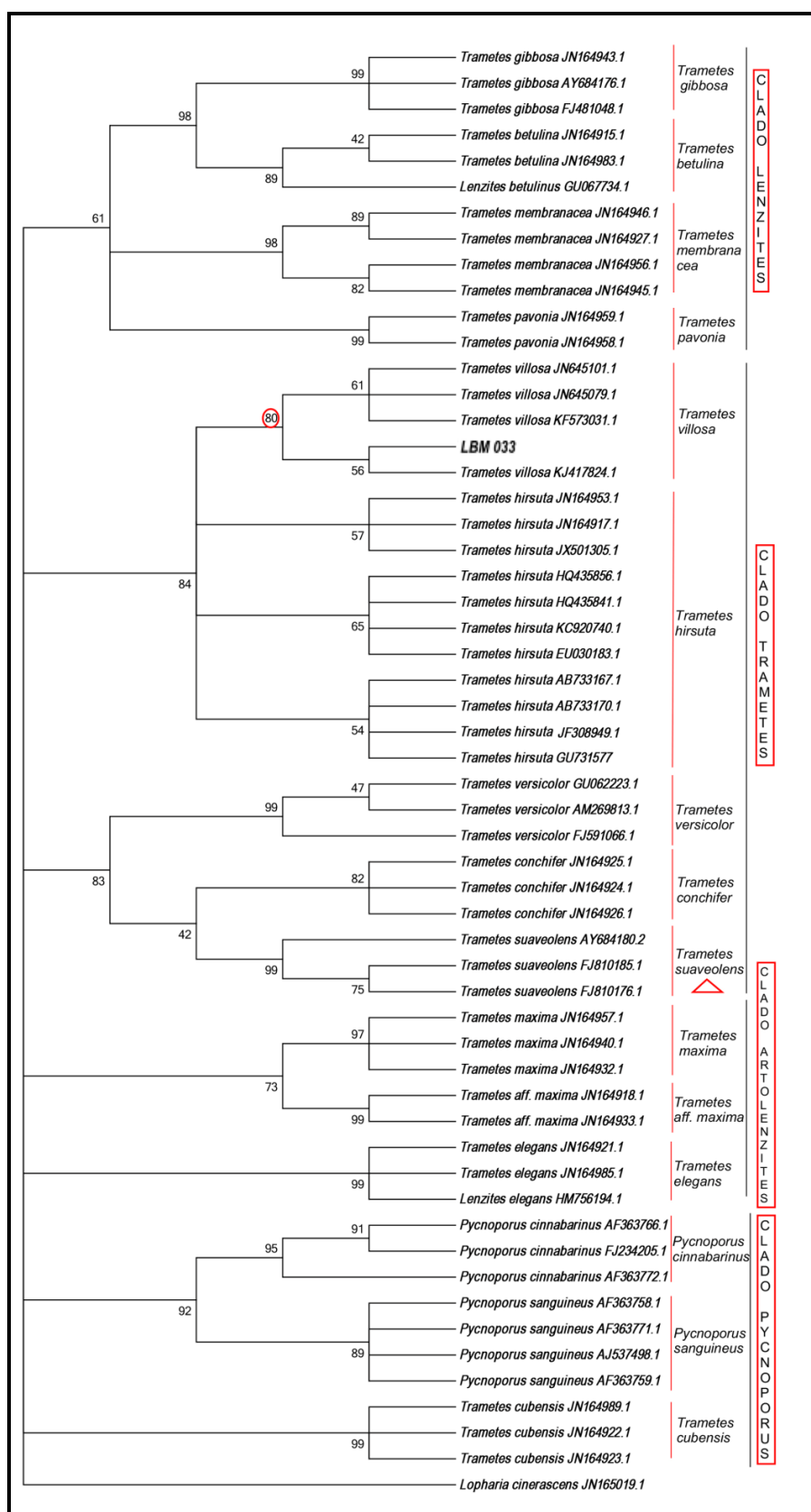


Figura 12: Árbol filogenético realizado por el método MP, basado en el alineamiento de la secuencia de ADN_r ITS del hongo en estudio con secuencias obtenidas del *GenBank* (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de *bootstrap* de interés. El triángulo representa la especie tipo de *Trametes*.

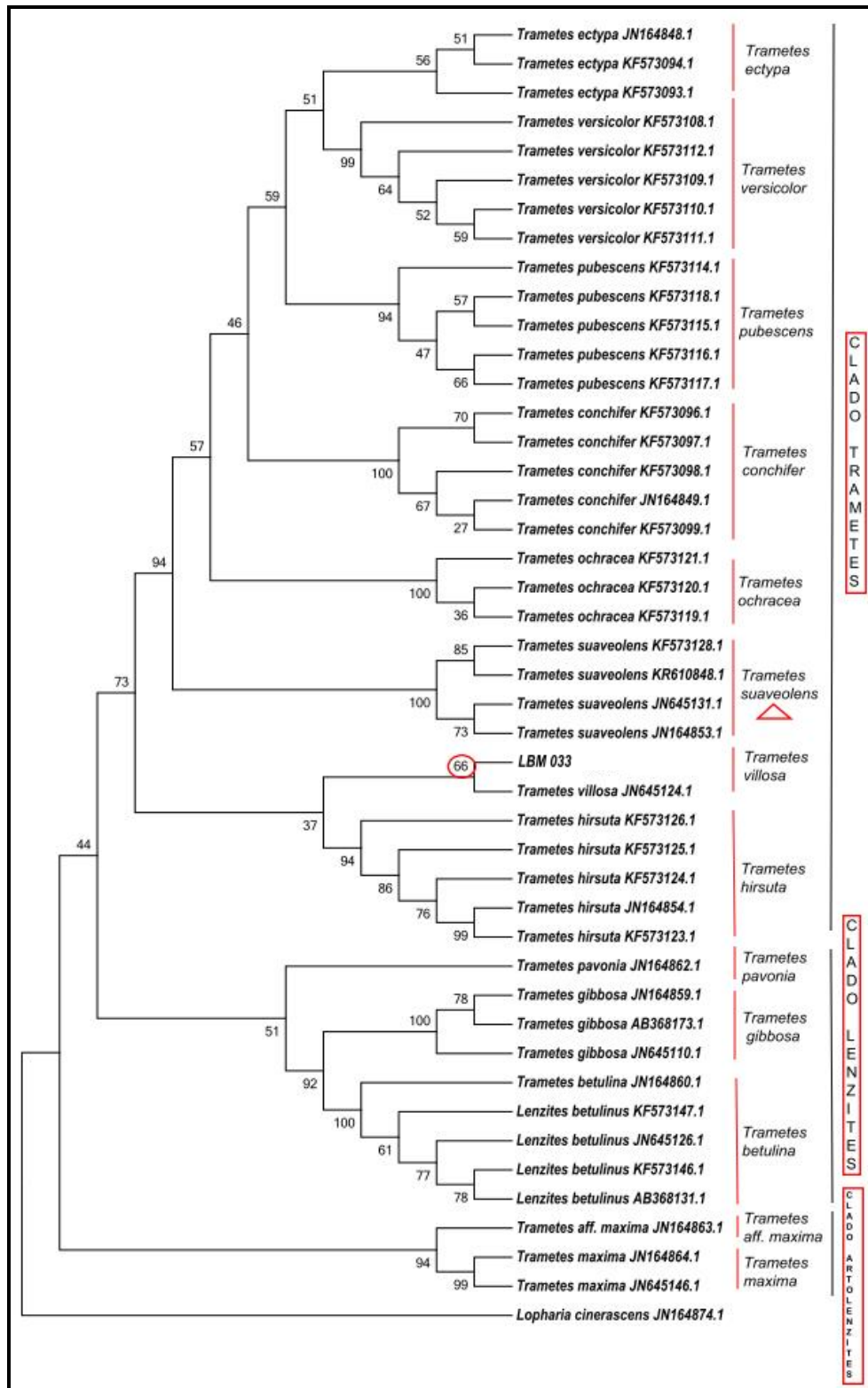


Figura 13: Árbol realizado por el método NJ, basado en el alineamiento de la secuencia comprendida entre los dominios conservados 6 y 7 del gen *rpb2* del hongo en estudio con secuencias obtenidas del *GenBank* (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de *bootstrap* de interés. El triángulo representa la especie tipo de *Trametes*.

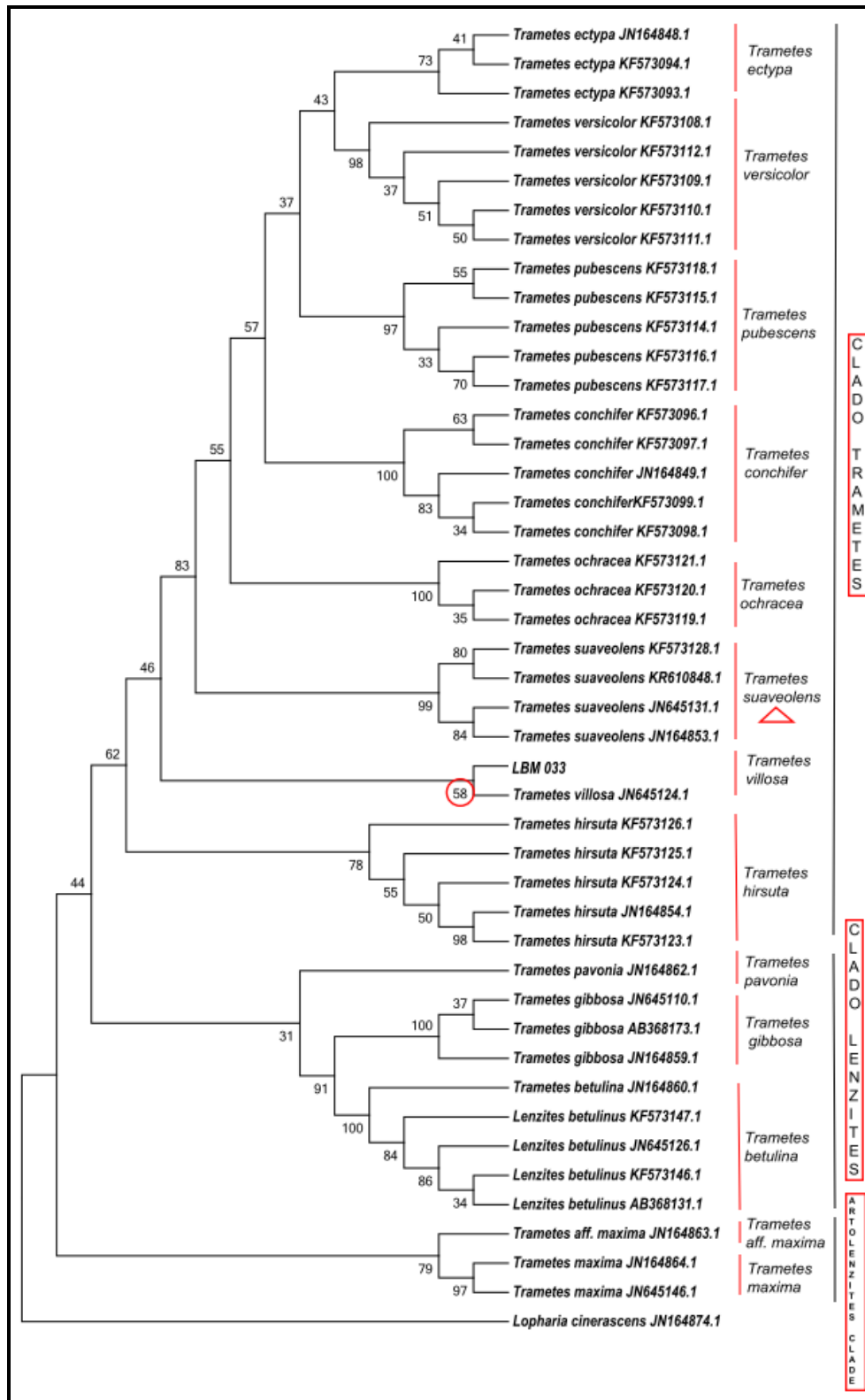


Figura 14: Árbol filogenético realizado por el método MP, basado en el alineamiento de la secuencia comprendida entre los dominios conservados 6 y 7 del gen *rpb2* del hongo en estudio con secuencias obtenidas del *GenBank* (NCBI). El círculo rojo muestra el valor de *bootstrap* de interés. El triángulo representa la especie tipo de *Trametes*.

5.3 Efecto de los nutrientes sobre la actividad CBH durante el cultivo sumergido de *T. villosa* LBM 033

Con el fin de escanear y determinar los nutrientes que afectaban los niveles de actividad CBH en *T. villosa* LBM 033 así como las concentraciones óptimas de los mismos, se realizó primero un diseño factorial fraccionado 1/32 con dos puntos centrales y luego un diseño compuesto central ortogonal 2^2 + estrella con tres puntos centrales.

5.3.1 Experimento de cribado

En el experimento de escaneo o cribado se determinó el efecto de los nutrientes celulosa cristalina, CMC, glucosa, bagazo de caña de azúcar, bagazo de mandioca, aserrín de pino, peptona, sulfato de amonio, extracto de levadura y tween 80 sobre la actividad CBH en el cultivo sumergido de *T. villosa* LBM 033. Las alícuotas del sobrenadante se extrajeron cada 6 días durante 24 días para determinar la actividad CBH según la sección 4.1.4, e identificar los nutrientes que influyeron significativamente sobre la actividad enzimática. En la tabla 7 se pueden observar los valores de actividad obtenidas para todas las corridas experimentales a los 6, 12, 18 y 24 días de cultivo.

Tabla 7: Valores de actividad CBH (en U/l) en las corridas experimentales detectadas a los 6, 12, 18 y 24 días en el cultivo sumergido de *T. villosa* LBM 033.

Corrida	Día 6 U/l	Día 12 U/l	Día 18 U/l	Día 24 U/l	Corrida	Día 6 U/l	Día 12 U/l	Día 18 U/l	Día 24 U/l
1	0,01	5,44	1,41	1,6	35	9,27	37,49	4,46	2,13
2	0,65	0,6	0,83	0,45	36	0,56	0,26	0,04	0
3	0	3,92	3,04	0,75	37	0	0,19	0,16	0
4	0	0,12	0,2	0,49	38	0,04	0,11	0,09	2,78
5	7,87	13,74	11,38	8,17	39	4,72	6,46	3,1	3,96
6	6,73	9,49	31,17	12,79	40	28,82	85,42	51,81	18,93
7	0,2	2,12	4,38	4,31	41	0,21	1,92	1,13	17,58
8	1,98	57,16	3,83	8,92	42	0	11,36	5,46	3,21
9	0,19	0,34	0,93	0,01	43	2,26	2,3	0,4	0,62
10	3,56	11,38	17,92	5,21	44	1,22	19,41	33,13	32,05
11	0,09	4,1	3,05	2,05	45	0,01	2,15	5,4	1,87
12	0,11	0,16	1,61	32,35	46	0,02	0,11	0,12	17,32
13	8,3	16,07	4,31	4,57	47	0,29	11,55	11,02	9,77
14	16,91	66,55	68,31	42,45	48	4,76	46,63	48,3	53,53
15	2,35	35,16	12,04	7,74	49	0,39	9,32	4,54	2,49
16	0	0,03	0,05	0,1	50	0,49	0,01	0	0
17	0,13	0,41	0,07	0,52	51	0,58	0,14	0,16	0,41

Continuación Tabla 7

Corrida	Día 6 U/l	Día 12 U/l	Día 18 U/l	Día 24 U/l	Corrida	Día 6 U/l	Día 12 U/l	Día 18 U/l	Día 24 U/l
18	25,66	69,36	61,72	19,85	52	29,78	81,7	84,43	22,39
19	0,81	34,07	6,99	6,42	53	0,58	33,06	2,69	3,97
20	0,27	2,38	15,81	3	54	0,67	3,15	3,4	27,57
21	27,79	19,43	12,17	4,1	55	16,6	19,43	10,15	3,7
22	2,88	2,11	4,27	2,34	56	33,82	24,43	14,67	17,13
23	1,57	3,43	3,97	3,24	57	0,45	3,58	2,56	6,59
24	3,17	8,9	9,06	5,11	58	1,52	9,69	3,92	9,85
25	36,35	7,27	0,41	0,77	59	32,13	8,67	2,77	1,55
26	0,4	0,18	0,65	0,25	60	0,29	0,19	0,32	0,12
27	0,48	12,21	10,81	6,77	61	0,33	1,05	20,33	5,56
28	1,27	23,8	3,92	12,74	62	39,61	48,74	25,76	7,96
29	20,02	15,57	31,52	7,52	63	43,3	46,39	40,12	8,92
30	6,95	31,96	31,48	38,63	64	19,54	36,45	21,36	45,23
31	0,25	0,3	0,45	0,4	65	0,23	0,42	0,42	0,42
32	11,25	34,17	66,29	96,4	66	1,68	61,2	66,29	51,19
33	8,13	42,36	26,3	2,27	67	9,41	51,81	41,19	33,59
34	12,08	15,52	22,04	58,5	68	10,77	19,34	24,43	9,53

En una primera instancia, se realizó una prueba de múltiples rangos y una optimización de múltiples respuestas para determinar el día óptimo de cultivo respecto a la actividad CBH (Tabla 8). En estos análisis se observaron dos grupos homogéneos, uno formado por los días 6 y 24 y otro formado por los días 24, 18 y 12, siendo este último grupo el que presentó las medias más altas ($P \leq 0,05$). A partir de estas pruebas estadísticas se seleccionó el día 12 para continuar los análisis por presentar una media de 18,1 U/l y un mayor valor óptimo predicho 38,8 U/l. En adición a estas ventajas, desde un punto de vista industrial un menor tiempo de cultivo es deseable frente a períodos más largos.

Tabla 8: Comparación entre las actividades enzimáticas medidas en U/l a los diferentes días de cultivo. Las cruces alineadas indican grupos homogéneos.

	Media	Grupos Homogéneos	Óptimo
CBH día 6	7,3 U/l	X	22,7 U/l
CBH día 24	12 U/l	XX	19,3 U/l
CBH día 18	14,8 U/l	X	34,6 U/l
CBH día 12	18,1 U/l	X	38,8 U/l

Al analizar la actividad CBH el día 12 de cultivo, se observó que los factores celulosa cristalina, peptona y sulfato de amonio tuvieron un efecto significativo ($P \leq 0,05$) en la actividad enzimática en su nivel superior o positivo (Figura 15). Los valores estimados de los efectos fueron 12,1 para la celulosa, 16,9 para la peptona y 12,3 para el sulfato de amonio, con un error estándar de cada uno de estos efectos de 4,9 el cual mide su error de muestreo.

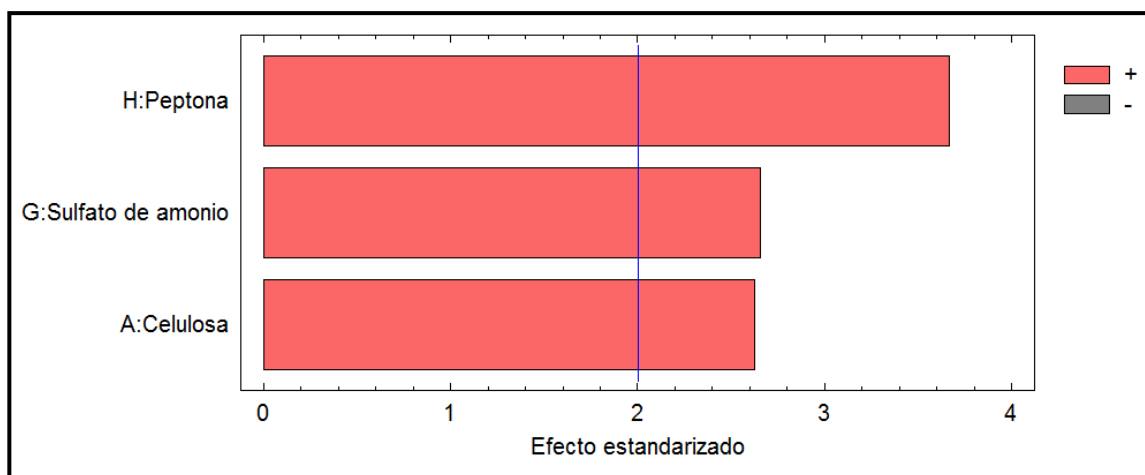


Figura 15: Diagrama de Pareto de los efectos promedio de los nutrientes en el medio de cultivo sobre los niveles de actividad CBH el día 12 del cultivo sumergido de *T. villosa* LBM 033. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado. Las barras más allá de la línea vertical representan los nutrientes con influencia significativa sobre la respuesta analizada con un nivel de confianza del 95 %.

5.3.2 Experimento de superficie-respuesta

Luego de seleccionar aquellos factores que afectaron significativamente a la actividad CBH en el cultivo de 12 días de *T. villosa* LBM 033 (punto 5.3.1), se llevó a cabo un experimento de superficie-respuesta de tipo diseño compuesto central ortogonal $2^2 +$ estrella con el fin de determinar los rangos de concentraciones de los compuestos nutricionales celulosa cristalina, peptona y sulfato de amonio necesarios para obtener los máximos niveles de la actividad enzimática. Los resultados de las corridas experimentales en base al diseño se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Valores de actividad CBH (en U/l) en las corridas experimentales detectadas a los 12 días de cultivo de *T. villosa* LBM 033.

Corrida	Actividad CBH (U/l)	Corrida	Actividad CBH (U/l)
1	0,28	10	5,36
2	4,88	11	4,72
3	10,77	12	6,97
4	6,99	13	16,49
5	0,74	14	0,8
6	16,01	15	71
7	11,33	16	62
8	5,46	17	51
9	24,52		

Las expresiones cuadráticas de todos los factores evaluados resultaron significativas en la actividad CBH, indicando que los valores óptimos de concentración tanto de la celulosa cristalina como de las fuentes de nitrógeno se encontraron en los puntos centrales del diseño (Figura 16). La ecuación del modelo ajustado que presenta los efectos de cada factor sobre la actividad enzimática, luego de excluir los factores no significativos, fue la siguiente:

$$CBH = 52,27 - 14,04 * celulosa^2 - 19,01 * sulfato\ de\ amonio^2 - 17,48 * peptona^2$$

El error estándar de cada uno de estos efectos, que mide su error de muestreo, fue de 9,5.

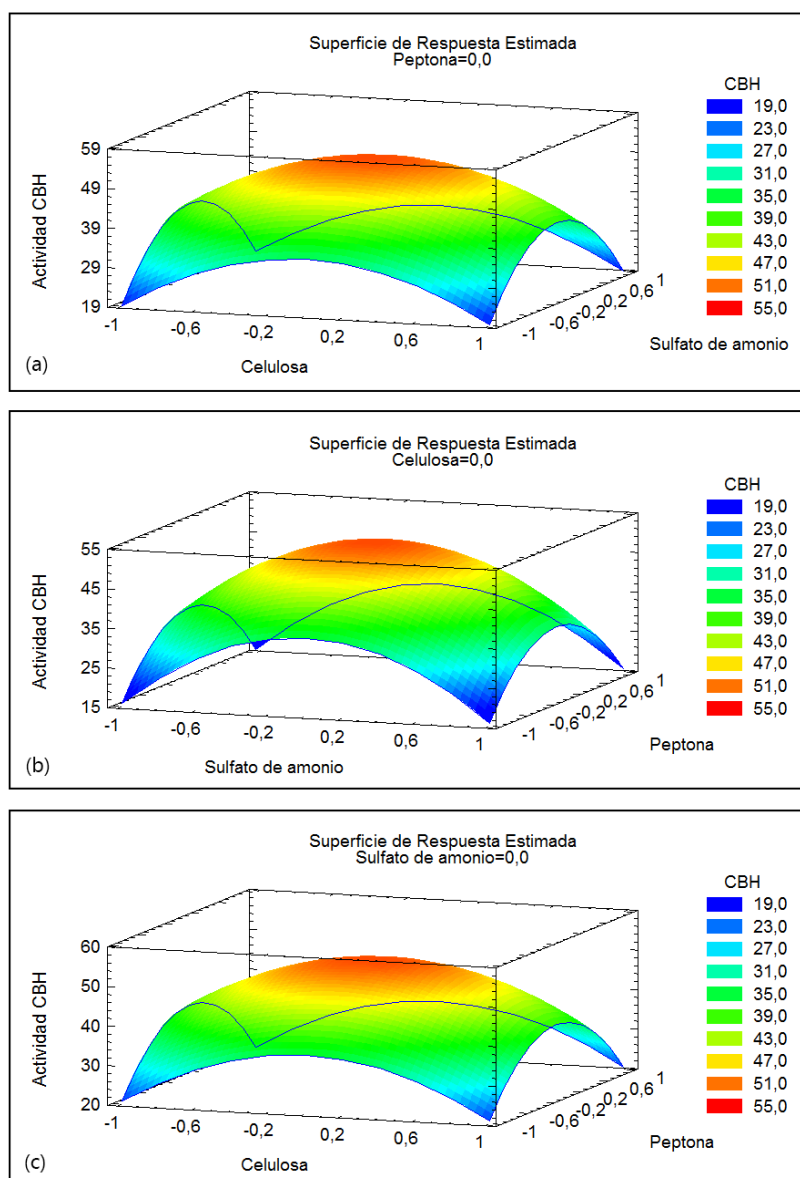


Figura 16: Diagrama de superficie-respuesta para la actividad CBH (α :0,5 %) en el sobrenadante de 12 días de cultivo de *T. villosa* LBM 033 para los factores celulosa y sulfato de amonio (a); celulosa y peptona (b); peptona y sulfato de amonio (c).

5.3.3 Validación del modelo

La decodificación de los valores óptimos sugeridos por el modelo fue de 3 g/l de peptona y de sulfato de amonio y 15 g/l de celulosa cristalina (tabla 10). Bajo estas condiciones el modelo estimó una actividad enzimática esperada de 52,2 U/l. Para validar esta predicción, se llevaron a cabo seis corridas experimentales adicionales utilizando las condiciones sugeridas por el modelo y se obtuvo un valor promedio de 49 ± 5 U/l, mostrando concordancia con el valor predicho.

Tabla 10: Decodificación de los valores óptimos sugeridos por el modelo, actividad enzimática estimada en esas condiciones y valor real obtenido.

FACTOR	ÓPTIMO	VALOR ÓPTIMO	VALOR REAL OBTENIDO
Peptona	3 g/l	52,2 U/l	49±5 U/l
Celulosa cristalina	15 g/l		
Sulfato de amonio	3 g/l		

5.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad CBH y su estabilidad en el sobrenadante de cultivo

El pH y la temperatura son variables que influyen en la actividad enzimática. Es por ello, que se analizó el efecto de la variación de estos parámetros en la actividad CBH en el sobrenadante de cultivo de *T. villosa* LBM 033 obtenido en las condiciones estandarizadas en el punto 5.3.3.

5.4.1 pH óptimo

La máxima actividad enzimática ($P < 0,05$) se encontró en las reacciones que se incubaron a pH 4,8, considerándose este valor de actividad enzimática como el 100 % (Figura 17). Mientras que a pHs de 4 y 5 la actividad CBH se mantuvo entre el 80 y el 90 %.

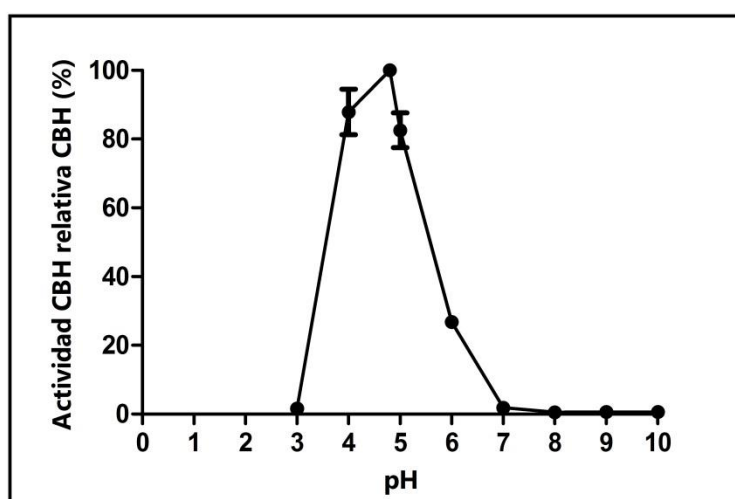


Figura 17: Actividad CBH relativa a diferentes valores de pH y a 50°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.

5.4.2 Temperatura óptima

La máxima actividad enzimática ($P < 0,05$) se encontró en las reacciones que se incubaron a 60°C, considerándose este valor de actividad enzimática como el 100 % (Figura 18). Además, se observó un $58,5 \pm 1,5$ % de actividad CBH a los 50°C.

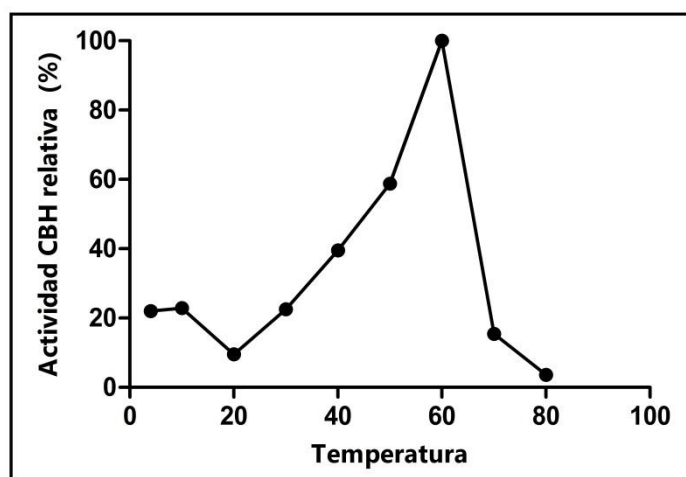


Figura 18: Actividad CBH relativa a diferentes valores de temperatura y a pH 4,8. Los datos son la media de los duplicados. El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.

5.4.3 Estabilidad en pH

La actividad enzimática residual fue definida como el porcentaje de actividad enzimática medida en un tiempo dado con respecto a la actividad enzimática en el tiempo inicial (cero). Para determinar la estabilidad enzimática, el sobrenadante se incubó a distintos pHs y se determinó la actividad CBH en diferentes intervalos de tiempo. A valores de pH de 3 y 7 se conservó alrededor de la mitad de la actividad enzimática inicial luego de 6 h de incubación (Figura 19 a). La Figura 19 b muestra la estabilidad enzimática medida a pH 4,8. En este caso, la actividad enzimática se mantuvo por encima del 50 % hasta las 72 h y comenzó a decaer a las 96 h.

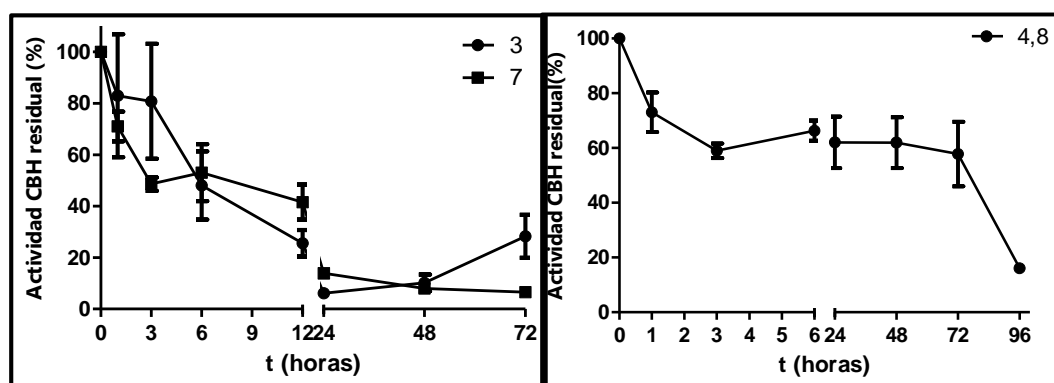


Figura 19: Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a pHs 3 y 7 (a) y 4,8 (b). El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.

5.4.4 Estabilidad en temperatura

La actividad enzimática residual fue definida como el porcentaje de actividad enzimática medida en un tiempo dado con respecto a la actividad enzimática en el tiempo cero. Para determinar la termoestabilidad, el sobrenadante se incubó a distintas temperaturas y se determinó la actividad CBH en diferentes intervalos de tiempo. Se observó que a 30°C, la actividad enzimática se mantuvo 24 h por encima del 50 %, mientras que cuando el sobrenadante fue incubado a 50°C, la actividad CBH decayó por debajo del 50 % en 1 h (Figura 20 a). La Figura 20 b muestra la estabilidad enzimática medida a 60 y 70°C. Para ambas temperaturas, la actividad CBH se mantuvo por encima del 50 % solamente 1 min.

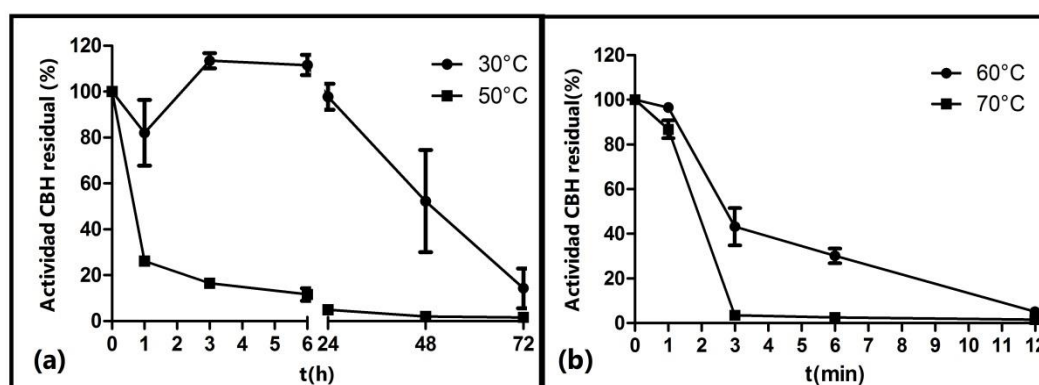


Figura 20: Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a 30°C, 50°C (a), 60°C y 70°C (b). El 100 % correspondió a 49 ± 5 U/l.

5.5 Micro-ensayos de hidrólisis enzimática sobre residuos de cebada

Con el propósito de evaluar el potencial para degradar la holocelulosa del sobrenadante de *T. villosa* LBM 033 en las condiciones estandarizadas en el punto 5.3.3, se determinaron las actividades enzimáticas hidrolíticas. Dado que para una hidrólisis eficiente el material debe ser pretratado para liberar toda o parte de la lignina, el sobrenadante se aplicó al residuo de cebada pretratado por extrusión. Finalmente, con el fin de evaluar esta sacarificación luego de 24 h a 50°C se midieron azúcares reductores por el método del DNS y se identificaron y cuantificaron por HPLC los azúcares resultantes de dicha hidrólisis.

5.5.1 Determinación de las actividades enzimáticas hidrolíticas en el sobrenadante

Las actividades enzimáticas hidrolíticas presentes en el sobrenadante obtenido en el punto 5.3.3 se determinaron con el fin de evaluar su potencial para ser aplicado en el proceso de sacarificación. Los valores obtenidos (Tabla 11) fueron suficientes para iniciar los micro-ensayos de hidrólisis sobre la biomasa lignocelulósica pretratada.

Tabla 11: Valores de actividad enzimática expresadas en U/I en el sobrenadante de cultivo de *T. villosa* LBM 033 en condiciones estandarizadas. Los valores representan las medias de los duplicados \pm el desvío estándar.

Actividad CMCasa	Actividad S/PASC	Actividad endo- β -1,4-xilanasa	Actividad avicelasa	Actividad FPasa
834,6 \pm 33,8 U/I	156,7 \pm 4,6 U/I	718,7 \pm 47,4 U/I	9,6 \pm 3,6 U/I	133,1 \pm 13,8 U/I

5.5.2 Análisis de los rendimientos de hidrólisis de los diferentes sustratos

Con fin de verificar la actividad enzimática cuantificada en el sobrenadante y evaluar su potencial para hidrolizar la holocelulosa se calcularon los azúcares reductores (en mg/ml) y se identificaron y cuantificaron por HPLC los azúcares liberados (en mg/ml) en la hidrólisis de los sustratos celulósicos CMC y PASC y el sustrato hemicelulósico xilano soluble de madera de Haya.

A partir de los valores de azúcares reductores (Tabla 12) se calcularon los porcentajes de sacarificación de los sustratos que fueron 40,5 %, 15,3 % y 38,9 % para CMC, PASC y xilano respectivamente.

A partir de los valores de glucosa, xilosa y celobiosa liberados en la hidrólisis de todos los sustratos poliméricos (Tabla 12) se calcularon los porcentajes de conversión o hidrólisis. Los cromatogramas obtenidos por HPLC se observan en la Figura 21. No se detectaron azúcares en ninguno de los controles (datos no mostrados). En cuanto a los porcentajes de hidrólisis, el principal producto de la hidrólisis del CMC fue celobiosa (63,8 %) seguido de glucosa (5,8 %), mientras que en la hidrólisis de PASC los valores fueron: celobiosa 15,2 % y glucosa 4 %.

Estos resultados confirman que el sobrenadante tuvo actividad hidrolítica sobre la celulosa, siendo capaz de liberar azúcares de menor tamaño a partir de polisacáridos, los cuales podrían ser fermentados a etanol. En cuanto a la actividad hidrolítica sobre las hemicelulosas, dio lugar a xeloligosacáridos pero no a xilosa.

Tabla 12: Azúcares liberados (mg/ml) en la hidrólisis de los sustratos CMC, PASC, y xilano utilizando el sobrenadante de *T. villosa*, LBM 033.

	Azúcares reductores	Celobiosa (mg/ml)	Glucosa (mg/ml)	xilotriosa (mg/ml)	xilobiosa (mg/ml)
CMC	0,9±0,03	1,34±0,04	0,13	-	-
PASC	0,85±0,02	0,8±0,24	0,22±0,05	-	-
XILANO	2,2 ± 0,2	-	-	0,46±0,06	1,26±0,11

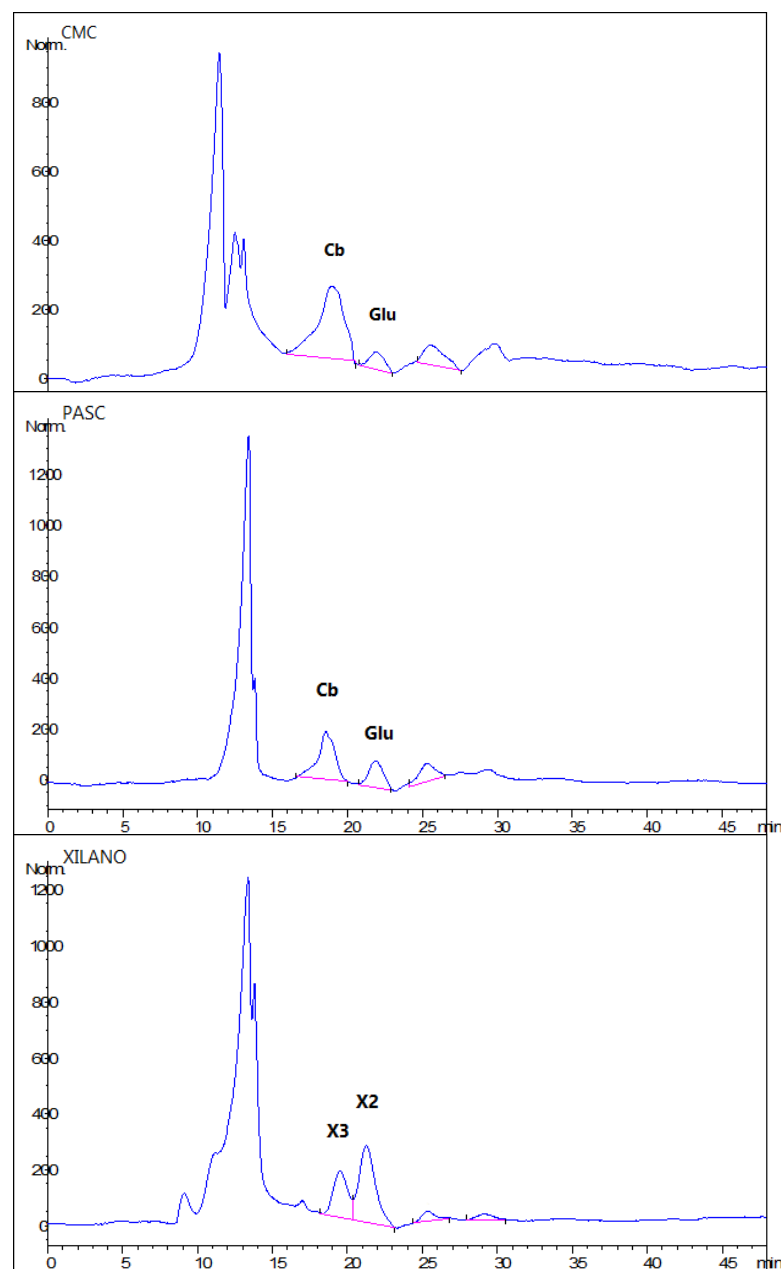


Figura 21: Productos de la hidrólisis de los sustratos CMC, PASC y xilano utilizando el sobrenadante de *T. villosa* LBM 033 determinados por HPLC. Cb: cellobiosa, Glu: glucosa, X2: xilobiosa, X3: xilotriosa.

5.5.3 Hidrólisis del residuo de cebada

La reacción de hidrólisis del residuo de cebada pretratado se realizó con el sobrenadante de cultivo de *T. villosa* concentrado 5 veces (residuo de cebada + sobrenadante) y se determinaron los azúcares reductores totales liberados. A su vez, se realizó un ensayo de hidrólisis con la enzima comercial (residuo de cebada + enzima

comercial) y 3 controles (control sobrenadante, control enzima comercial y control sustrato) (Tabla 13). Con los valores obtenidos de azúcares reductores fue posible, luego de restar los valores correspondientes a los controles, calcular los porcentajes de sacarificación. El sobrenadante de cultivo de *T. villosa* obtuvo un porcentaje de hidrólisis de la holocelulosa de 29,3 % en contraposición con el valor de 63,7 % obtenido con la enzima comercial. En cuanto a la identificación por HPLC de los azúcares individuales resultantes de la hidrólisis del residuo de cebada por el sobrenadante de *T. villosa* se encontró aproximadamente la misma cantidad de glucosa en la reacción que en el sobrenadante de cultivo (Figura 22), por lo tanto se puede decir que no se lograron cuantificar los azúcares individuales resultantes de la hidrólisis. Sin embargo, se pudieron cuantificar los porcentajes de conversión a glucosa (33,2 %) y xilosa (30,4 %) cuando se utilizó la enzima comercial.

Tabla 13: Azúcares liberados (en mg/ml) en los ensayos de hidrólisis de residuo de cebada pretratado utilizando el sobrenadante de *T. villosa* LBM 033.

	Azúcares reductores (mg/ml)	Glucosa (mg/ml)	Arabinosa (mg/ml)	Xilosa (mg/ml)
Residuo de cebada + sobrenadante	4,39 ± 0,05	0,56±0,02	-	-
Residuo de cebada + enzima comercial	11,08± 0,76	2,65±0,13	0,13±0,01	1,89±0,11
Control sobrenadante	0,33±0,13	0,67±0,17	-	-
Control enzima comercial	2,26 ± 0,04	0,1	-	-
Control sustrato	0,49±0,24	-	-	-

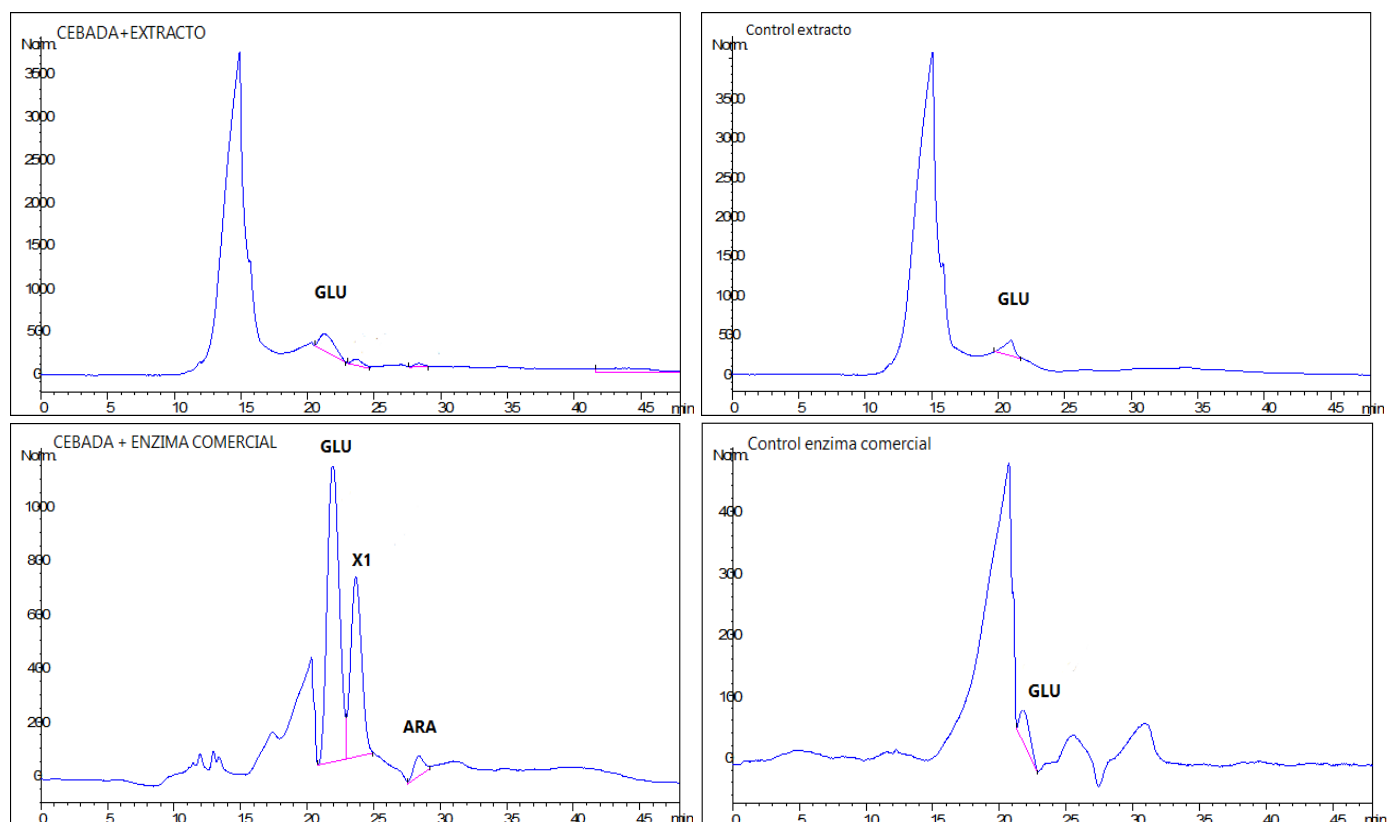


Figura 22: Productos de la hidrólisis del residuo de cebada pretratado con el sobrenadante de *T. villosa* LBM 033 y la enzima comercial y sus respectivos controles determinados por HPLC. ARA: arabinosa, GLU: glucosa, X1: xilosa.

5.6 Caracterización de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas

El sobrenadante de cultivo de *T. villosa* LBM 033 fue centrifugado, filtrado y procesado a fin de ser analizado por espectrometría de masas. Este análisis permitió caracterizar el secretoma de *T. villosa* LBM 033 en las condiciones estandarizadas del medio de cultivo enriquecido en CBHs. No se logró cuantificar el contenido de proteínas totales en los controles.

5.6.1 Visualización de proteínas totales separadas por SDS-page

Se realizó un gel de poliacrilamida para visualizar las proteínas totales separadas por electroforesis desnaturalizante en el cual se observó nítidamente solo una banda de un peso molecular correspondiente a aproximadamente 44,5 kDa (Figura 23), la cual se podría corresponder con la actividad CBH detectada. Para confirmarlo, se procedió a

realizar un análisis del secretoma de *T. villosa* LBM 033 mediante espectrometría de masas.

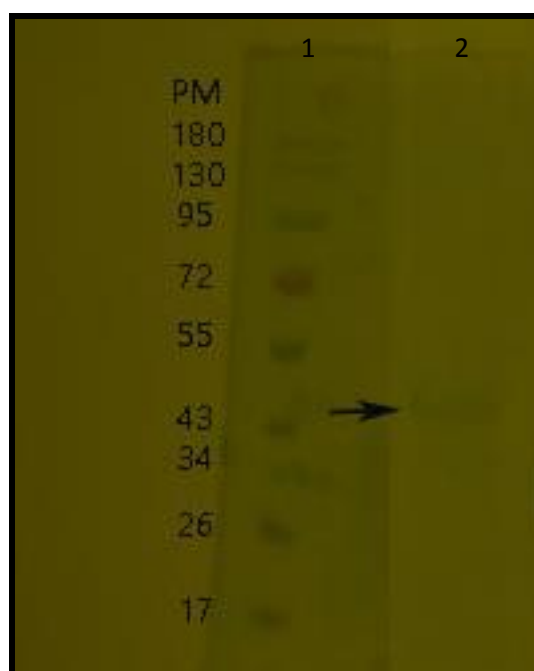


Figura 23: Carril 1: Marcador de peso molecular Phage Ruler pre-stained protein ladder (Thermo Scientific). Carril 2: Sobrenadante de *T. villosa* en las condiciones estandarizadas de cultivo.

5.6.2 Identificación de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas

Como el genoma de *T. villosa* aún no ha sido secuenciado y almacenado en las bases de datos públicas, se utilizó como referencia el genoma de *T. versicolor* para la predicción de las proteínas secretadas por *T. villosa* LBM 033 en las condiciones estandarizadas de cultivo. Se lograron identificar y caracterizar 17 proteínas con una confianza alta (Tabla 14). La proteína principal identificada fue una CBH. Sin embargo, no se identificaron EGs o BGLs. Dentro de aquellas proteínas cuya función biológica está relacionada con la degradación de la lignocelulosa, además se encontraron cinco peroxidasas (MnPs y LiPs), las cuales intervienen específicamente en la degradación de la lignina y una celobiosa-deshidrogenasa (E.C.1.1.99.18), la cual coopera con las peroxidasas y las celulasas en la descomposición de los componentes del complejo lignocelulósico. Además, se detectaron: una proteína perteneciente a la familia 18 de las glicosil-hidrolasas (probablemente una quitinasa, EC 3.2.1.14), una metaloproteínasa extracelular (EC 3.4.24), una proteína conteniendo dominio HET, una proteína

conteniendo un dominio de unión al co-factor FAD, una proteína conteniendo el dominio STE y cinco proteínas que no pudieron ser identificadas.

Nueve de las 17 proteínas presentaron al menos dos péptidos únicos, siendo esta la condición necesaria para asegurar su identidad con la máxima confianza. Para la CBH y una de las peroxidasas se obtuvieron 2 péptidos únicos; para 2 peroxidasas, la celobiosa-deshidrogenasa, la metaloproteínasa extracelular, la glicosil-hidrolasa de la familia 8 y una proteína no caracterizada, 3 péptidos únicos y 4 para la restante peroxidasa. En este contexto, el 66 % de las proteínas secretadas por *T. villosa* en las condiciones optimizadas de cultivo identificadas correspondieron a enzimas relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica.

Tabla 14: Proteínas identificadas en el sobrenadante de cultivo de *T. villosa* a través de espectrometría de masas.

Descripción	#acceso	#péptidos	#péptidos Únicos	Secuencia	aas	PM (kDa)	pI
Celobiohidrolasa	Q9P8N1	2	2	VVAVIEPDSLNLVTNLNVQK	436	46,1	5,83
				AASVANIPTFTWLDSVAK			
Peroxidasa	Q6B6M9	4	3	LTFHDAIGISPAIAR	364	38,3	5,06
				TACEWQSFVNNQAK			
				LNVFGR			
				LNVFGRK			
Metaloproteinasa extracelular	R7S9H1	3	3	VNAFYIVNSIHDTYK	601	63,9	5,48
				MFLWDLTSPQR			
				MFLWDLTSPQR			
				DAWIQADANR			
proteína no caracterizada	R7S863	3	3	KGDLATPLVLASGFDILLGR	135	14,4	6,54
				DVFVPPVLYPHAGTVWTK			
				GDLATPLVLASGFDILLGR			
Peroxidasa	Q99057	4	4	DATRPAPDGLVPEPFDLTLEDVFAR	368	39,3	4,93
				ITFHDAISFSPAMEAR			
				LDFFLGR			
				LQTDHLLAR			
Peroxidasa	Q6B6N0	4	3	KDATQPAPDLTVPEPFDDVSK	364	38,3	4,97
				DATQPAPDLTVPEPFDDVSK			
				TACEWQSFVNNQAK			
				LDVFLGR			
Peroxidasa	Q6KB26	2	2	LVPLPSDSVTDILAR	364	38,1	4,53
				LQSDFLIGR			
Glicosil-hidrolasa	R7S7Q1	3	3	YDLGLDFDWEYPNK	436	45,1	4,16
				FINEAGLR			
				TVLNLVSK			
Celobiosa deshidrogenasa	O42729	3	3	DNVLVTQVIR	768	81,4	5,22
				ALVNPWLTVNSVDK			
				IGVDAALNAK			

Continuación Tabla 14

Descripción	#acceso	#péptidos	#péptidos Únicos	Secuencia	aas	PM (kDa)	pI
Proteína con dominio de unión HET	R7S7D1	1	1	LMQRVEELQREVNDTR	759	84	6,8
Peroxidasa	Q12435	1	1	LQSDFAIAR	367	38,8	4,4
proteína no caracterizada	R7S6B1	1	1	DPDSLGGSTVESDASLPSTPSKPAAV- GAIFFAPRTPTTAPQVEVHPGK	1078	114,7	6,2
proteína no caracterizada	R7S8V2	1	1	AFLVTDVYGR	364	38,5	4,6 9
proteína no caracterizada	R7S644	1	1	QFLACNPILWVKSQHWFGYLAAR	1017	115,6	7,9 4
Proteína con dominio de unión FAD	R7S6Q1	1	1	KYDPEGLLDWCQCVGWK	579	62,3	7,4 9
Proteína condominio de unión STE	R7S686	1	1	TLQERELNNLDK	128	14,4	8,5 1
proteína no caracterizada	R7S6N7	1	1	NLSTGSNVYLHPSNPNSADASVR	564	63,1	7,8 3

Péptidos: número de secuencias de péptidos totales.

Péptidos únicos: número de secuencias de péptido únicas.

Secuencia: secuencia de aminoácidos que componen el péptido.

AAs: número de aminoácidos que componen el péptido.

PM (kDa): masa de los péptidos, en Kilodaltons.

pI: punto isoeléctrico.

Péptido señal: presencia o ausencia de péptido señal.

5.6.3 Caracterización de la CBH

Los fragmentos peptídicos de *T. villosa* LBM 033 VVAVIEPDSLNLVTNLNVQK y AASVANIPFTTWLDSVAK fueron idénticos a los de la CBH de *T. versicolor* con N° de acceso Q9P8N1 (Uniprot). En cuanto a su estructura primaria, la proteína consistió en 436 aas, presentó un pI de 5,83 y un peso molecular de 46,1 kDa, correspondiéndose con la banda observada en el gel de poliácridamida. El porcentaje de hidrofobicidad fue -0,18 lo que indicó que se trata de una proteína soluble.

La estructura modular de esta proteína consistió en un CBM (*Carbohydrate-binding module*) de tipo 1 que va desde la posición 8 a la 34 y un sitio catalítico *Glyco_hydro_6* que va desde la posición 96 a la 402. Los dos péptidos únicos de 18 y 21 aas que permitieron identificar a la proteína se ubicaron en el sitio catalítico o CD (Figura 24).

```
>Q9P8N1 Celobiohidrolasa
MFKFAAAGQCGGVGWTGR TTCVSGSVCSKQNDYYSQCISGAGAPGTTVAPTTAPTAPATSA
PGGSPTTVSAPSTPSSTPAAGNPFTGFQVYLSPPYSAEIASAAA AVTDSSLKAKAASVANIPFTT
WLDSVAKVPDLGTYLADASSIQTKTGQKQLVPVVYELPDRDCAAKASNGEFSIADAGAENYK
DYIDQIVPQIKQFPDVRVVAVIEPDSLNLVTNLNVQKCANGGTYKASVTYALQQLSSVGVTM
YMDAGHAGWLGWPANIQPGSEVFAEMFKSADFVAFVRAFATNVREYNALTAAFPRPITQGN
PNYDEFPIYQVRPMLKSPGFPAQFVVDQGRAGQQNFRQQWGDWCNIKGAGFGTRPTTST
GNPLIDAIWVKPGGESDGTSSSSPRYDSTLLSVRRDDPAPEAGTWFAQYFETLVSKPTRPL
```

Figura 24: Secuencia aminoacídica de la CBH de *T. versicolor* N° de acceso Q9P8N1 (Uniprot). **Azul:** sitio de unión a la celulosa (CBM). **Rojo:** sitio catalítico. Los péptidos únicos identificados en *T. villosa* se encuentran subrayados.

La clasificación de las glicosilhidrolasas en más de 100 familias está basada en las similitudes de las secuencias de aas y por lo tanto, su forma de plegamiento. Esto permite realizar una serie de predicciones útiles ya que algunas características como el mecanismo de acción (retención o inversión) se conservan dentro de una familia.

El análisis de la secuencia de esta CBH en la base de datos *p-fam* permitió clasificarla como una CBHII (EC 3.2.1.91), perteneciente a la familia 6 de las glicosil-hidrolasas. En esta familia es característico el mecanismo molecular de inversión.

En la figura 25 se puede observar esquemáticamente la organización de los dominios característicos de la familia, es decir, un CBM tipo 1 y un sitio catalítico *Glyco_hydro_6*. Dicha organización modular permite a las CBHs de esta familia actuar

de forma procesiva desde los extremos no reductores de las cadenas de celulosa para generar celobiosa, contribuyendo a la degradación de dicho polímero.



Figura 25: Organización de los dominios de las enzimas pertenecientes a la familia 6 de las glicosil-hidrolasas, como la CBHII. Verde: sitio de unión a la celulosa. Rojo: Dominio catalítico (<http://pfam.xfam.org/protein/Q9P8N1>).

6. DISCUSIÓN

6.1 Selección de Políporos (Polyporaceae, Agaricomycetes) aislados de Misiones productoras de celulasas

La ecoregión de la selva misionera se destaca por su gran diversidad biológica (Wright *et al.*, 2008). Es por ello que se espera que un gran número de organismos fúngicos puedan ser aislados en este ambiente. La capacidad de secretar celulasas de los aislamientos es una de las habilidades más importantes para la aplicación en procesos biotecnológicos. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de *screening* realizados en este trabajo mostraron que, entre los hongos de pudrición blanca estudiados, el aislamiento LBM 033 emergió como un organismo productor de celulasas muy prometedor.

Aunque un gran número de organismos son capaces de degradar la celulosa, sólo unos pocos producen cantidades significativas de enzimas capaces de hidrolizar completamente la celulosa cristalina. Los hongos han recibido la mayor atención en la industria debido a su mayor productividad enzimática. El método utilizado para obtener niveles más altos y sistemas celulolíticos más eficaces es examinar nuevas cepas productoras de celulasas. Esto se ha estado realizando desde hace ya varios años utilizando placas de agar que contienen CMC o PASC para la detección de celulasas producidas por hongos filamentosos. Las cepas hipercelulolíticas, que dan lugar a zonas de hidrólisis mayores que rodean a las colonias después de 3-6 días de incubación, generalmente se seleccionan y se estudian posteriormente (Wang *et al.*, 2012).

El *screening* de hongos productores de EGs en medio sólido, el cual puede considerarse semi-cuantitativo, reveló que el aislamiento LBM 033 tuvo los mayores valores de IEC. Al mismo tiempo, este aislamiento, mostró los mayores valores de actividad EG, BGL y CBH en el cultivo sumergido.

Además, en este trabajo se describieron métodos eficientes y fáciles para el *screening* de organismos productores de CBHs y BGLs con técnicas de detección de fluorescencia en placa (Coniglio *et al.*, 2017). Estos ensayos pueden considerarse

exclusivamente cualitativos y las cepas fueron clasificadas como positivas o negativas para la actividad enzimática. En el ensayo cualitativo para la actividad CBH, no se observaron diferencias entre las placas correspondientes a los aislamientos que resultaron positivos. Sin embargo, en las placas evaluadas para la actividad BGL se encontraron algunas diferencias cualitativas.

A continuación, se seleccionaron los once aislamientos que resultaron positivos para las tres actividades enzimáticas evaluadas en placas para realizar el ensayo cuantitativo en cultivo sumergido. Entre todas las actividades enzimáticas, la actividad EG, fue más alta que la actividad CBH en todos los aislamientos estudiados, tal como se reporta usualmente en la bibliografía (Falkoski *et al.*, 2012).

Mandels & Reese ya en 1957, indicaron que las celulasas fúngicas se produjeron sólo en presencia de celulosa como sustrato de crecimiento. En un trabajo más actual, se ensayó la capacidad de *Fomitopsis palustris* para producir enzimas celulolíticas extracelulares (EG, CBH y BGL) usando un cultivo líquido que contenía celulosa cristalina 2 % y los niveles de las tres actividades enzimáticas aumentaron bruscamente después de 8 días de cultivo (Yoon & Kim, 2005). En el presente estudio, las actividades EG, BGL y CBH fueron bajas o nulas en todas las cepas estudiadas en los dos primeros periodos evaluados (4 y 8 días de incubación) aumentando también la actividad celulolítica de todas las cepas luego de estos días.

En cuanto a los valores de actividad EG alcanzados en el *screening* cuantitativo, dentro de los aislamientos referidos como *Trametes*, LBM 033 produjo 387 U/l a los 24 días; LBM 030, 322,1 U/l a los 12 días y LMB 031, 325,6 U/l a los 32 días. Kachlishvili *et al.* (2012) reportaron que cuando un aislamiento de *T. versicolor* de bosques de Georgia fue cultivada en estado sólido en cáscara de mandarina, la actividad enzimática fue muy cercana a la encontrada en este trabajo y cuando la misma especie fue cultivada en cultivo sumergido (Irbe *et al.*, 2014) los valores de actividad enzimática alcanzados fueron de 100 U/l (en medio suplementado con glicerol) y 700 U/l (en medio suplementado con salvado de trigo).

Por otra parte, entre los aislamientos referidos como *Pycnoporus*, LBM 020 y LBM 014 mostraron valores de actividad enzimática de 335 U/l y 315,7 U/l respectivamente a los 28 días de cultivo y LBM 038, un valor de 314,7 a los 24 días de cultivo. Estos valores fueron mayores al valor de 116 U/l, citado previamente en la literatura cuando una cepa de *P. sanguineus* de México fue cultivada en un medio suplementado con CMC (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015). Además, cuando *P. sanguineus* PF2 perteneciente a la colección de la Universidad Federal de Viscosa, Minas Gerais, Brasil, fue cultivado en fermentación sumergida usando mazorca de maíz como fuente de carbono (Falkoski *et al.*, 2012), la actividad BGL fue 250 U/l. Este valor es cercano al valor óptimo encontrado en este trabajo.

Según lo reportado por Liew *et al.* (2011), la especie *P. coccineu* alcanzó una actividad máxima de actividad celulasa de 649 U/l en el día 60, mientras que *T. versicolor* mostró una actividad de 104 U/l el día 40 de cultivo. En el presente trabajo, el máximo pico de actividad enzimática fue alcanzado en los 12, 24 y 28 días de cultivo para las enzimas CBH, EG y BGL respectivamente, acortando los tiempos de cultivo, lo cual puede constituir una mejora en los procesos productivos.

La comparación de cepas productoras de celulasas es muy importante para la caracterización industrial del secretoma completo, así como para el estudio de la expresión de las celulasas. Cada productor de celulasas tiene su propio perfil de celulasas, el cual es significativo desde un punto de vista industrial (Dojnov *et al.*, 2015). La multiplicidad de celulasas surge principalmente a nivel de ARNm (post-transcripcional) debido al empalme diferencial del ARNm primario generando dos variantes de mRNAs que producen dos enzimas diferentes. *Schizophyllum commune*, por ejemplo, puede secretar las tres principales celulasas con dos tipos distintos de celulasas expresadas a partir de cada ARNm con diferentes pesos moleculares (CBHs 59.3 y 58.2 KDa; EGs 40.6 y 39.4 KDa y BGLs, 95.7 y 93.8 KDa). La multiplicidad de celulasas surge tanto de la heterogeneidad del mRNA como de la glicosilación diferencial. Se dice que *T. reesei* secreta celulasas extracelulares de hasta 30 g/l. Sin embargo, la mayoría de estas enzimas se producen en múltiples formas. Se ha argumentado que la razón principal para la existencia de múltiples formas de celulasas

es la proteólisis después de la secreción. Se ha observado que junto con niveles bajos de proteínas extracelulares, la expresión de celulasas también desencadena la expresión de proteasas que hidrolizan las celulasas dando tanto multiplicidad enzimática como especificidad enzimática hacia la celulosa (Juturu & Wu, 2014).

El método más comúnmente usado para estimar el peso molecular de las enzimas es SDS-PAGE (Sajith *et al.*, 2016). Las EGs son monoméricas con masas moleculares típicamente entre 22 y 45 kDa, sin embargo, fueron encontradas enzimas de casi el doble de tamaño en *Sclerotium rolfsii* y *Gloeophyllum sepiarium* (Baldrian & Valášková, 2008). En este trabajo, las bandas de los aislamientos estudiados estuvieron en el rango de 69–88 kDa. Además, fueron detectadas isoenzimas de 30 y 39 kDa.

Las enzimas CBHs son también usualmente monoméricas con un peso molecular que varía típicamente entre 39 y 65 kDa aunque en *Dichomitus squalens* se encontró una CBH más pequeña, con un peso molecular de 36 kDa (Manavalan *et al.*, 2015). En este trabajo la masa molecular de las CBHs fue de 45 kDa en todos los casos, reportándose también algunas enzimas de 36 y 65 kDa.

La asociación del colorante Rojo Congo y la celulosa microcristalina o la CMC genera una coloración intensa que se desvanece antes de la despolimerización (Teather & Wood, 1982). La existencia de diferencias entre las bandas observadas en los geles no desnaturizantes y los geles desnaturizantes puede explicarse por diferencias en esta interacción. A su vez, Chang *et al.* (2012) mostraron que la actividad de AMCEL-5B, una celulasa bifuncional encontrada en insectos xilófagos, está generalmente influenciada por productos químicos. Algunos compuestos, como iones metálicos, detergentes y agentes reductores/oxidantes pueden afectar la acción dinámica entre las enzimas y sus sustratos. La actividad celulasa de AmCel-5B fue aumentada en presencia de los iones Ca_2^+ , Co_2^+ , Mg_2^+ , Mn_2^+ , Zn_2^+ , ditioneitol y 2-mercaptoetanol e inhibida por ácido etilendiaminotetraacético y SDS. La influencia de estos agentes químicos en la actividad celulasa sugiere que algunos cationes divalentes pueden actuar con algunos aminoácidos básicos (Arg, His y Lys) o ácidos (Asp y Glu) de las enzimas celulasas.

Existen muchos estudios en sistemas celulolíticos fúngicos, pero estos están limitados generalmente a unas pocas especies como *T. reseei* y *P. chrysosporium*. Los hongos cumplen un rol clave en la degradación de la biomasa vegetal en los ecosistemas, es por ello que es de suma importancia poner énfasis en el estudio de especies fúngicas nóveles y en la exploración de los ecosistemas de regiones tan biodiversas como la selva paranaense con el fin de aislar nuevos organismos xilófagos que cuenten con una gran habilidad de degradar la celulosa.

6.2 Identificación molecular del aislamiento seleccionado

Algunas especies de *Trametes* y sus géneros relacionados son tan similares en características de microestructura que es difícil identificarlos y clasificarlos por taxonomía tradicional debido a sus características morfológicas muy similares. En los últimos años, los micólogos han intentado utilizar datos de secuencias para resolver los problemas taxonómicos en el grupo *Trametes*. El ITS fue analizado para inferir la posición filogenética de varias especies de *Trametes*. La secuencia ITS tiene un valor significativo para la clasificación en hongos debido a su tasa evolutiva apropiada (Cui *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de filogenias basadas en secuencias de un solo marcador, especialmente ITS1 e ITS2, está actualmente algo desacreditada, ya que algunos hongos y plantas tienen copias parálogas. Por consiguiente, el análisis combinado de secuencias de ITS1 e ITS2 con genes de una sola copia se ha utilizado con éxito (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002). En 1999, Liu y *et al* demostraron que *rpb2*, el gen que codifica la segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II, contiene una región variable entre los dominios 6 y 7 que puede ser filogenéticamente útil para estudios entre especies con bajos niveles taxonómicos. Esto se debe a que *rpb2* es un gen de una sola copia de gran tamaño con una modesta tasa de cambio evolutivo. Es por ello que en este trabajo se utilizaron ambos marcadores para la identificación del aislamiento LBM 033.

Sin embargo, los datos de las secuencias de estos genes de copia única son a veces escasos en las bases de datos públicas para muchas especies de *Trametes* y taxones relacionados (Justo & Hibbett, 2011). De hecho, la secuencia obtenida correspondiente al gen *rpb2* del aislamiento LBM 033 (N° de acceso KY987516) es la segunda secuencia

para *T. villosa* subida al banco de genes del NCBI, lo que aporta una valiosa herramienta en la identificación de futuros aislamientos del grupo *Trametes* a nivel global. Este hecho explica las diferencias en la selección de las especies que integraron los árboles realizados para cada marcador, es decir, 15 especies para ITS y 13 especies para *rpb2*.

Si bien los métodos moleculares representan una estrategia potencialmente más sensible y rápida que las técnicas morfológicas y adicionalmente eliminan una serie de limitaciones, la identificación molecular no está exenta de obstáculos. Se ha estimado que cerca del 20 % de las secuencias génicas fúngicas depositadas en las bases de datos se corresponden a datos erróneamente identificados o al mal registro de los mismos debido usualmente a una incorrecta identificación taxonómica del hongo. Incluso, las reglas poco definidas para la incorporación de nuevas secuencias en las bases de datos, como la presencia de secuencias defectuosas o ambiguas son motivos que llevan a identificaciones moleculares erróneas, generando confusiones y complicaciones (Castrillo, 2015). Es por ello, que con el fin de evitar estos obstáculos se decidió utilizar solamente aquellas secuencias disponibles en las bases de datos que estuvieran debidamente publicadas.

El alineamiento de las secuencias de la región ITS1-5,8S-ITS2 y el gen *rpb2* de la cepa LBM 033 mostró un alto nivel de identidad con secuencias válidamente publicadas. Mientras que los árboles obtenidos con ambos marcadores fueron altamente congruentes, el árbol construido a partir del ITS dio lugar a un soporte mucho mayor en la rama que contenía al aislamiento LBM 033. Cabe destacar además que los árboles construidos a partir del alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en este trabajo de ITS y *rpb2* y las secuencias obtenidas de las bases de datos reflejaron fielmente la filogenia aceptada actualmente para el grupo *Trametes*. (Justo & Hibbett, 2011).

Los análisis realizados permitieron identificar al aislamiento LBM 033 como *Trametes villosa*.

T. villosa es uno de los hongos en repisa más comunes en las regiones tropicales, caracterizado por su fructificación blanquecina, delgada, plegable, a menudo concrecente con la superficie superior pilosa y sus grandes poros hexagonales y playos. Fue incorporado en el "Atlas pictórico del parque nacional Iguazú" como una de las 100 especies más singulares (Wright *et al.*, 2008). *T. villosa* es, a su vez, una especie con un potencial biotecnológico probado. Sin embargo, poco se sabe sobre la fisiología de este hongo (Yamanaka *et al.*, 2008).

El aislamiento, selección e identificación de organismos es una de las maneras más importantes de obtener nuevas celulasas. Estos nuevos organismos seleccionados son fuentes de nuevos genes de celulasas con diversas propiedades (Juturu & Wu, 2014). Al igual que el aislamiento LBM 033, las tres cepas descartadas en el *screening* de actividad celulolítica en medios sólidos, LBM 002, LBM 010 y LBM 018 fueron identificadas como cepas de *T. villosa* por nuestro grupo de investigación (González, 2013). Como sucede en este trabajo, es común observar que diferentes aislamientos de una especie presenten comportamientos muy diferentes y es por ello que la búsqueda de nuevas cepas sigue siendo necesaria en el afán de contar con organismos con características novedosas y prometedoras para su empleo en procesos biotecnológicos (Fonseca *et al.*, 2016).

6.3 Efecto de los nutrientes sobre la actividad CBH durante el cultivo sumergido *T. villosa* LBM 033

Las CBHs fúngicas son de particular interés ya que los potentes hongos celulolíticos son capaces de producir dos formas diferentes de las enzimas CBH: CBHI y CBHII (Chukeatirote *et al.*, 2012) que representan en conjunto los componentes principales del complejo celulasa, tal como se reportó para *T. reesei* (Uusitalo *et al.*, 1991) y *Volvariella volvacea* (Jia *et al.*, 1999).

Los microorganismos necesitan de condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para su desarrollo. El principal objetivo de los medios de cultivos es crear un ambiente adecuado para el crecimiento asegurando el apropiado funcionamiento de su maquinaria enzimática. Para el desarrollo de un medio de cultivo es necesario

seleccionar adecuadamente los componentes a usar. Esto incluye la selección del tipo y la concentración de los diferentes nutrientes. El empleo de una apropiada metodología estadística es lo que hace posible la obtención de un medio de cultivo óptimo, de modo de explotar completamente el potencial de las cepas seleccionadas. Existen numerosos métodos y diseños estadísticos que son aplicados con éxito en la optimización de sistemas en microbiología. Los diseños factoriales fraccionados no constituyen métodos de optimización sino que indican de manera confiable la importancia de cada elemento en el medio de cultivo. La RSM, en cambio, es un conjunto de técnicas usadas para el estudio de las relaciones empíricas entre una o más respuestas que son medidas y el diseño de las variables o factores que los crearon. Estos métodos estadísticos consisten en un cuidadoso diseño de experimentos y el análisis de los subsiguientes datos. Generalmente, las relaciones determinísticas que gobiernan el comportamiento de las respuestas para el conjunto de variables son tan complejos como desconocidos. Por consiguiente, las aproximaciones en forma de modelos empíricos son necesarias para determinar estas leyes (Gómez & Batista, 2007). Dado que la producción de las celulasas está influenciada por varios parámetros tales como pH, temperatura, agitación, concentración de sustrato, tipo de fuente de nitrógeno y de carbono, etc., estos métodos estadísticos se emplean efectivamente para el cribado de variables independientes que afectan significativamente la producción de enzimas y para estandarizar los parámetros del proceso mejorando la eficacia de las tecnologías de fermentación antes de la industrialización, promoviendo así las utilidades de diversos microorganismos como fuentes potenciales de bioproductos (Sajith *et al.*, 2016).

Deswal *et al.* (2012) realizaron un diseño factorial a dos niveles (Plackett-Burman) con el fin de identificar los factores fisiológicos y parámetros que influían significativamente en la producción de CBHs en el hongo de pudrición parda *Fomitopsis* sp. RCK2010 concluyendo que ni la temperatura ni el pH afectaban a la producción de la enzima. Además, Levin & Forchiasin (1997) compararon la producción de CBHs por *T. trogii* en agitación y estado estacionario usando celulosa cristalina como única fuente de carbono, no encontrando diferencias significativas entre estos dos estados de cultivo. En este trabajo, se evaluaron los componentes nutricionales del

medio, manteniendo constantes las condiciones físicas. La producción de la mayor parte de las celulasas fúngicas se encuentra en el intervalo de pH de 4,5-5. Particularmente, en un estudio realizado en *T. hirsuta* (Dave *et al.*, 2014), se observó que el pH óptimo para la producción de CBHs fue de 4,5 y la temperatura óptima de 30°C.

Es por todo lo expuesto que se decidió realizar los ensayos de estandarización del medio de cultivo de *T. villosa* LBM 033 a pH 4,5 y $28 \pm 2^\circ\text{C}$, al igual que los ensayos de *screening* iniciales de todos los aislamientos. De igual manera, los ensayos se realizaron en agitación debido a la naturaleza insoluble de algunos componentes permitiendo así el mayor contacto del sustrato con las enzimas presentes en el medio de cultivo.

La regulación de la producción de las celulasas es controlada por mecanismos de activación y represión, por lo tanto, las celulasas son conocidas como enzimas inducibles. Sólo en presencia del sustrato, estas enzimas son inducidas y son reprimidas en presencia de azúcares fácilmente utilizables (Behera *et al.*, 2017). Muchos estudios se realizaron para optimizar las actividades EG, BGL y FPasa. Sin embargo, hay muy pocos estudios enfocados en optimizar la actividad CBH. Uno de los trabajos más importantes realizados en este sentido fue "inducción, represión y des-represión en la síntesis de CBH en *Aspergillus niger*", realizado por Hanif *et al.* en 2008, en el cual encontraron que la producción de enzimas fue variable según la fuente de carbono. En ese trabajo los niveles de CBH fueron mínimos incluso en presencia de bajas concentraciones de glucosa y estimulados por otros carbohidratos. El presente trabajo de tesis es el primero en estudiar el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno mencionadas en la Tabla 2 en la actividad CBH de un cultivo sumergido de *T. villosa* a través de diseños experimentales.

Como primer paso, se realizó un ensayo de cribado para seleccionar los nutrientes agregados al medio líquido Czapek que afectaron significativamente a la actividad CBH en el cual se seleccionaron las fuentes de nitrógeno peptona y sulfato de amonio y la fuente de carbono sintética celulosa cristalina. Luego, se realizó un diseño compuesto central en el cual se seleccionaron las concentraciones de dichos nutrientes, estandarizando el medio de cultivo para la producción de CBHs en un cultivo

sumergido de *T. villosa* LBM 033. Los valores estandarizados de las concentraciones de los nutrientes fueron 3 g/l para las fuentes de nitrógeno y 15 g/l para la celulosa.

Es difícil comparar la producción de celulasas por distintas cepas debido a las diferencias en las condiciones de fermentación, la composición de los medios y las materias primas empleadas para su cultivo. Además, una comparación directa de las actividades enzimáticas en diferentes trabajos de investigación también se ve dificultado por las diferencias en los métodos de ensayo y la forma en que se expresan las actividades. Esto sucede incluso a pesar de que existe un ensayo aprobado por IUPAC para la determinación de la actividad enzimática de las celulasas (Kuhad *et al.*, 2016).

A pesar de lo expuesto, la producción de celulasas se reportó en medios sintéticos en muchos hongos. En 2007, Niranjane *et al.* evaluaron la influencia de glucosa, xilosa, CMC, celulosa microcristalina y celobiosa como fuentes de carbono para la producción de celulasas por el hongo de pudrición blanca que coloniza la madera de coníferas, *Phlebia gigantea*. La CMC permitió el mayor rendimiento, seguido de celobiosa y celulosa cristalina. La glucosa y la xilosa no produjeron ninguna celulosa detectable, lo que sugiere la represión de las celulasas en presencia de estos carbohidratos simples, confirmando que la producción de celulasas depende del consumo de fuentes de carbono en el medio. Además, el mayor rendimiento de celulasas en presencia de CMC y el menor rendimiento en presencia de celobiosa, indica el requisito de cristalinidad y complejidad para la mayor producción de celulasas.

Similares resultados se encontraron en bacterias. La actividad celulasa de *Bacillus subtilis* AS3 se potenció optimizando la composición del medio mediante métodos estadísticos, obteniendo un aumento significativo de la actividad enzimática con el agregado de CMC, peptona y extracto de levadura (Deka *et al.*, 2011).

En un trabajo similar anterior (Lee *et al.*, 2011) en el cual se evaluó la actividad CBH de *A. arvensis* cuando se cultivó en un medio líquido conteniendo distintas fuentes de carbono y nitrógeno, la máxima producción de CBH se observó en presencia de paja de arroz (20 g/l) y una combinación de extracto de levadura (5 g/l) y peptona (5 g/l).

Mahmood *et al.* (2013) también informaron que la peptona mejoró la producción de CBHs en *A. fumigatus*. Esto pudo deberse al hecho de que la peptona contiene aminoácidos que son fuentes de nitrógeno fácilmente disponibles para el crecimiento de los hongos y la producción de enzimas extracelulares, como las celulasas. En ese mismo trabajo también se encontró que el sulfato de amonio era adecuado para la producción de CBHs por *A. fumigatus*, actuando como fuente inorgánica de nitrógeno y aumentando la producción de enzimas. Además, el Tween 80 aumentó la producción de CBHs en este caso.

En este trabajo, la fuente de carbono que produjo la mayor actividad CBH fue la celulosa cristalina, un carbohidrato complejo y cristalino. Similares resultados habían sido encontrados ya por Hanif *et al.*, (2004), quienes también habían sugerido que hay otro mecanismo regulador para la síntesis de CBH además de la inducción. Este mecanismo de regulación disminuye la biosíntesis de la CBH cuando el organismo se cultiva en sustratos fácilmente metabolizables y diferentes fuentes de nitrógeno. Además, encontraron que una de las mejores fuentes de nitrógeno fue el sulfato de amonio. La peptona, también fue descrita como un factor presente en el medio optimizado para la producción de celulasas en un cultivo sumergido de varias especies fúngicas, entre ellas, *A. niger* (Acharya *et al.*, 2008).

Sin embargo, el otro carbohidrato complejo sintético evaluado en este trabajo, la CMC (el componente amorfo de la celulosa y sustrato de las EGs) no resultó significativo para la actividad CBH. Las CBHs atacan preferencialmente a las regiones cristalinas de la celulosa. Es por ello, que resultó razonable que haya sido la celulosa cristalina el sustrato que produjo un aumento en los títulos de actividad CBH y no la CMC.

En general, los trabajos que seleccionaron la CMC como fuente de carbono para el aumento de la producción de las celulasas proponen como método de determinación de la actividad celulasa aquel que utiliza CMC como sustrato, empleando muchas veces el término celulasa como sinónimo de CMCase o EG y desestimando de esta manera la actividad CBH.

En cuanto a los sustratos lignocelulósicos, ninguno fue significativo para la actividad CBH. Este resultado podría deberse a títulos bajos o nulos de la actividad de enzimas oxidativas que degraden la lignina y dejen expuesta la celulosa, permitiendo la inducción de la actividad CBH, tal como se verificó al no detectar actividad lacasa en el sobrenadante estandarizado (datos no mostrados).

6.4 Efecto del pH y la temperatura en la actividad CBH y su estabilidad en el sobrenadante de cultivo

El pH y la temperatura son variables que influyen en la actividad enzimática. Además, debido a los extremos de pH y temperatura involucrados en la conversión de biomasa a biocombustibles, se buscan EGs, CBHs y BGLs estables para la conversión enzimática de biomasa (Yennamalli *et al.*, 2013). Es por ello, que se analizó el efecto de la variación de estos parámetros en la actividad CBH en el sobrenadante de cultivo de *T. villosa* LBM 033.

El pH y la temperatura óptimos para la actividad CBH de *T. villosa* LBM 033 fueron 4,8, y 60°C respectivamente. Estas propiedades son similares a las encontradas para la mayoría de CBHs s aisladas de diversos sistemas fúngicos (Tabla 15).

A pesar de que la temperatura óptima fue de 60°C, cuando se evaluó la termoestabilidad, a 60 y 70°C, la actividad CBH se mantuvo por encima del 50 % solamente 1 min. Sin embargo, a 30°C se observó que la actividad enzimática se mantuvo 24 h por encima del 50 %, mientras que cuando el sobrenadante fue incubado a 50°C, la actividad CBH decayó por debajo del 50 % en 1 h. Estos resultados son similares a los hallados en *Agaricus arvensis*, cuya CBH tuvo una temperatura óptima de 65°C y una vida media de 65 min a 50°C (Lee *et al.*, 2011). Es probable que después de 60°C, la actividad CBH disminuya rápidamente debido a la desnaturalización de la estructura enzimática a temperaturas más altas (Mahmood *et al.*, 2013). En la Tabla 15 se detallan resultados con respecto a la termoestabilidad observados en otras especies. En este sentido, Lantz *et al.* (2010) demostraron que los dos CBH (CEL6A y CEL7A) de *T. reesei* son más termolábiles que las otras enzimas implicadas en la descomposición de la celulosa (EG y BGL), siendo probable que limiten la velocidad del rendimiento de la

mezcla de celulasa completa a temperaturas de sacarificación superiores a 50°C (Druzhinina & Kubicek, 2017).

Tanto la CBH perteneciente a la familia 7 de las glicosil-hidrolasas TvCel7 (la primer celulasa de *T. versicolor* que se ha clonado y caracterizado) (Lahjouji *et al.*, 2007) como la CBHI termoestable de *Thermoascus aurantiacus* (Hong *et al.*, 2003) fueron estables en una amplio rango de pHs. Sin embargo, si bien la actividad enzimática de *T. villosa* LBM 033 se mantuvo por encima del 50 % hasta las 72 h y comenzó a decaer a las 96 h a pH 4,8, a los pHs 3 y 7 la actividad CBH se mantuvo alrededor del 50 % luego de 6 h de incubación.

Tabla 15: Propiedades de CBHs de diferentes especies fúngicas.

Especie/CBH	pH óptimo	T óptima (°C)	Termoestabilidad	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>Agaricus arvensis</i> /CBH	4	65	2 h a 40° C, 65 min a 50° C, 23 min a 60° C y 12 min a, y 70° C.	ND	Lee <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus fumigatus</i> /CBH	4,8	55	ND	ND	Mahmood <i>et al.</i> , 2013
<i>Chaetomium thermophilus</i> /CT2	65°C	5	1 h a 70°C	66,3	Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Chrysosporium lucknowense</i> /CBH IA	4,5	ND	5 h a 50°C	65	Gusakov <i>et al.</i> , 2005
<i>Chrysosporium lucknowense</i> /CBH IB	ND	ND	5 h a 50°C	60	Gusakov <i>et al.</i> , 2007
<i>Chrysosporium lucknowense</i> /CBH IIA	5,5	65	5 h a 50°C	43	Bukhtojarov <i>et al.</i> ,2004
<i>Fomitopsis pinicola</i> /CBH	5	50	42 h a 70°C	64	Shin <i>et al.</i> , 2010
<i>Irpex lacteus</i> /Ex-1	5	50	ND	53	Hamada <i>et al.</i> , 1999
<i>Irpex lacteus</i> /Ex-2			ND	56	
<i>Irpex lacteus</i> /Ex4	5	50	ND	60	Toda <i>et al.</i> , 2008
<i>Lentinula edodes</i> /CEL7A	7	50	ND	53,5	Taipakova <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium occitanis</i> /CBH I	4-5	60	30 min a 60°C	60	Limam <i>et al.</i> , 1995
<i>Penicillium occitanis</i> /CBH II		65		55	

Continuación Tabla 15

Especie/CBH	pH óptimo	T óptima (°C)	Termoestabilidad	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>Talaromyces emersonii</i> /CBH IA	3,6	78	34 min a 80° C	66,1	Tuohy <i>et al.</i> , 2002
<i>Talaromyces emersonii</i> /CBHIB	4,1	66-69	68 min a 80° C	56,3	
<i>Talaromyces emersonii</i> /CBHII	3,8	68	38 min a 80° C	56,2	
<i>Thermoascus aurantiacus</i> /CBHI	6	65	1 h a 65° y 1 y días a 50° C	ND	Hong <i>et al.</i> , 2003
<i>Trametes versicolor</i> /TvCel7	5	40	30 min a 60° C	55	Lahjouji <i>et al.</i> , 2007

ND: No determinado

6.5 Micro-ensayos de hidrólisis enzimática sobre residuos de cebada

En este trabajo se ensayó la hidrólisis de residuo de cebada pretratado por extrusión utilizando el sobrenadante de cultivo de *T. villosa* LBM 033. El sobrenadante se aplicó directamente teniendo en cuenta que hay claros indicios de que existen proteínas con función aún desconocida que pueden contribuir a la hidrólisis de la lignocelulosa. Por este motivo, las mezclas en bruto son preferibles a las enzimas individuales ya que muchas de estas proteínas aparentemente superfluas pueden contribuir a la hidrólisis (Van Dik & Pletschke, 2012). Sumado a esto, la ventaja de aplicar el sobrenadante sin purificar implica una reducción en los costos de la aplicación biotecnológica de las enzimas.

Para que la hidrólisis del material celulósico sea efectiva, además de requerir un material en el cual el pretratamiento haya eliminado toda o parte de la lignina, se debe contar con un cóctel enzimático que actúe sobre los diferentes componentes y formas de la holocelulosa. Con el propósito de determinar si el sobrenadante de *T. villosa* LBM 033 cumplía con este requisito, se determinaron las actividades endo- β -1,4-xilanasas (718,7 \pm 47,4 U/l), CMCase (834,6 \pm 33,8 U/l), avicelasa (9,6 \pm 3,6 U/l) y sobre PASC (156,7 \pm 4,6 U/l), cuyos valores fueron suficientes para iniciar los micro-ensayos de hidrólisis sobre la biomasa lignocelulósica pretratada. A su vez, con el fin de verificar esta actividad enzimática y el potencial del sobrenadante de hidrolizar la holocelulosa,

se determinaron los porcentajes de sacarificación de los sustratos CMC (40,5 %), PASC (15,3 %) y xilano (38,9 %). Los porcentajes de conversión en azúcares fueron 63,8 % (celobiosa) y 5,8 % (glucosa) para CMC, mientras que en la hidrólisis de PASC los valores fueron: celobiosa 15,2 % y glucosa 4 %. Estos resultados confirmaron la actividad hidrolítica sobre la celulosa, liberando azúcares de menor tamaño que podrían ser fermentados a etanol.

En general, cuando se desea conocer el rendimiento de la hidrólisis, especialmente con vistas a su aplicación en la producción de bioetanol, este se expresa en relación a la conversión en los monómeros glucosa y xilosa, es decir, los azúcares que luego pueden ser fermentados a etanol. Sin embargo, en este trabajo también se tuvo en cuenta el porcentaje de conversión a celobiosa ya que este es el producto principal de la acción de las CBHs, enzimas que son el foco de esta investigación. Se detectaron porcentajes mayores de conversión a celobiosa que a glucosa luego de la hidrólisis de CMC y PASC. Estos resultados son indicativos de la actividad CBH y de una pobre degradación de este dímero a glucosa. Esto último podría deberse a la existencia de títulos insuficientes de BGLs en el sobrenadante estandarizado de *T. villosa* LBM 033 para hidrolizar el dímero a glucosa. En este sentido, la mayoría de las celulasas producidas por hongos filamentosos, incluyendo *T. reesei*, están limitadas por la cantidad de BGLs. En adición, las BGLs se inhiben por su propio producto final (glucosa) y, lo que es más importante, también son inhibidas por su propio sustrato (celobiosa). Es por ello que el aumento del rendimiento de la hidrólisis de las biomasas deberá incluir también el mejoramiento de la producción de BGLs en la mezcla de celulasas producida por una cepa fúngica o bien la introducción de cantidades de BGLs externas, preferentemente tolerantes a altos niveles de glucosa (Singhania *et al.*, 2016).

La actividad hidrolítica sobre xilano, dio lugar a xeloligosacáridos pero no a xilosa. Las hemicelulasas son glicosil hidrolasas o carbohidrato esterasas representadas por xilanasas (EC 3.2.1.8), β -manasas (EC 3.2.1.78), arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) y β -xilosidasas (EC 3.2.1.37). El xilano, que constituye alrededor del 70 % de las hemicelulosas, es hidrolizado por las xilanasas a oligómeros, que se degradan a xilosa por acción de las β -xilosidasas. Además, también se requieren otras hemicelulasas

como la manasa y la arabinasa para la degradación completa de las hemicelulosas, que depende de su composición química (Sajith *et al.*, 2016). Si bien se logró cuantificar la actividad endoxilanasas en el sobrenadante, lo cual explica la detección de xelobiosa y xelotriosa, la ausencia de xilosa, análogamente a lo que ocurre con las BGLs, podría deberse a la existencia de títulos bajos o nulos de actividad β -xilosidasa en el sobrenadante que hidrolice los xeloligosacáridos a xilosa.

La actividad CBH en el sobrenadante había demostrado ser estable durante 24 h a 30°C. Por lo tanto, fue posible concentrar 5 veces el sobrenadante por centrifugación al vacío a una temperatura de 30°C durante 2 h antes de ser aplicado. Una vez verificada la acción hidrolítica del sobrenadante, se ensayó la hidrólisis del residuo de cebada pretratado y se obtuvo un porcentaje de hidrólisis de la holocelulosa de 29,3 %, en contraposición con el valor de 63,7 % obtenido con la enzima comercial. A su vez, no se lograron cuantificar los azúcares individuales resultantes de la hidrólisis con el sobrenadante de *T. villosa* LBM 033. Sin embargo, se pudieron cuantificar los porcentajes de conversión a glucosa (33,2 %) y xilosa (30,4 %) cuando se utilizó la enzima comercial. En este caso, se pudo observar que la suma de los porcentajes de conversión a glucosa y xilosa correspondió aproximadamente al total del porcentaje de sacarificación de la biomasa. Adicionalmente, en los cromatogramas se observó un pico que fue identificado como arabinosa. La aparición de dicho azúcar se debe a que es uno de los azúcares que constituyen la holocelulosa y es consecuencia de la hidrólisis producida por las enzimas (Conesa *et al.*, 2013).

El hecho de haber obtenido un índice de sacarificación de la holocelulosa cercano al 30 % y no haber logrado identificar y cuantificar dichos azúcares en el sobrenadante de *T. villosa* LBM 033, pudo deberse a una sacarificación incompleta, en la cual los polisacáridos fueron hidrolizados a oligosacáridos no identificados con los patrones utilizados en la técnica de HPLC realizada.

El valor de conversión a holocelulosa de 30 % es favorable teniendo en cuenta resultados previos. Por ejemplo, Alam *et al.*, (2011) reportaron los porcentajes de sacarificación para cuatro aislamientos de actinomicetes celulolíticos de 4,65 % y 3,05 % (aserrín), 2,52 % (bagazo de caña de azúcar) y 3,82 % (hoja seca). Porcentajes mayores

de bioconversión fueron reportados por Rodhe *et al.* (2011) en rastrojo de sorgo pretratado con NaOH utilizando una carga enzimática de 25 FPU/ g de biomasa luego de 36 h de incubación. El valor de sacarificación obtenido fue de 42,5 % siendo levemente superior al obtenido en esta tesis. Cabe destacar que la conversión obtenida en el presente trabajo presentó numerosas ventajas: se utilizó una carga enzimática menor, menor tiempo de incubación y no se pretrató el residuo de cebada químicamente. Además, en un trabajo anterior de nuestro grupo Giorgio (2014) estudió la bioconversión de la holocelulosa de aserrín de eucalipto, aserrín de pino y cascarilla de arroz durante 72 h por el extracto enzimático optimizado de otro hongo de pudrición blanca aislado de Misiones, *I. lacteus* BAFC 1168 repique F, obteniendo valores de 7,74 % 9,44 % y 27,19 % respectivamente, mientras que los controles con una celulasa comercial arrojaron valores de 7,19 % para el aserrín de eucalipto, 8,21 % para el aserrín de pino y 14,91 % en la bioconversión de cascarilla de arroz.

6.6 Caracterización de las proteínas secretadas en las condiciones estandarizadas

Para visualizar las proteínas totales presentes en el sobrenadante estandarizado de *T. villosa* LBM 033 separadas por electroforesis desnaturizante, se realizó un gel de poliacrilamida en el cual se observó nítidamente una banda única correspondiente a aproximadamente 44,5 kDa, la cual se podría corresponder con la actividad CBH detectada de acuerdo al peso molecular reportado para otras CBHs fúngicas (Tabla 15) y que no logró visualizarse en el zimograma realizado para la actividad CBH. Para confirmarlo, se realizó un análisis del secretoma de *T. villosa* LBM 033 en las condiciones estandarizadas para la actividad CBH, mediante espectrometría de masas.

La caracterización del secretoma permitió verificar la presencia de una CBH de 436 aas, con un peso molecular de 46,1 kDa, muy cercano al valor estimado con SDS-PAGE. Además, un análisis *in silico* permitió determinar un índice de hidrofobicidad de -0,18, confirmando que se trataba de una proteína extracelular. El valor de pI determinado de 5,83, es típico para las CBHs extracelulares de otros hongos caracterizados (Shim *et al.*, 2010).

El hábito de los hongos depende de la absorción de los nutrientes ambientales que se ponen a disposición a través de la acción de conjuntos de enzimas hidrolíticas secretadas. En consecuencia, la secreción de proteínas es crucial para la vida y el crecimiento de los hongos. Esta capacidad de secreción enzimática ha sido explotada por la industria durante décadas. El secretoma se define como el conjunto de proteínas secretadas por una célula o un organismo en un momento dado. Hay dos puntos de vista que deben tenerse en cuenta en este contexto. En primer lugar, en un sentido amplio el secretoma incluye tanto las proteínas que se liberan en el medio circundante como las que permanecen unidas a la membrana o a la pared celular o que son proteínas integrales de membrana. En segundo lugar, el secretoma, como el transcriptoma, es muy variable dependiendo de las condiciones ambientales incluyendo el sustrato de crecimiento, la temperatura y la fase de crecimiento. Aunque el número de estudios transcriptómicos fúngicos está aumentando constantemente, no es suficientemente grande aún para explicar cómo un secretoma se modula en respuesta a las condiciones ambientales en diferentes especies. Sin embargo, se espera que el estudio de los secretomas fúngicos empleados en diferentes estrategias de degradación de la lignocelulosa facilite su uso en el tratamiento de la biomasa como materia prima para la producción de biocombustibles y otros procesos de biorefinería (Alfaro *et al.*, 2014).

La identificación de proteínas y péptidos en análisis proteómicos se basa en la espectrometría de masas y permite la medición precisa de la masa molecular de una proteína o péptido y su identificación buscando su masa en el conjunto completo de las masas moleculares de las proteínas o péptidos producidos por un organismo cuya secuencia genómica es conocida (Alfaro *et al.*, 2014). El genoma de *T. villosa* aún no ha sido secuenciado. Sin embargo, para el análisis del secretoma producido por este organismo pueden usarse genomas y proteomas de referencia. Dentro del género *Trametes* se encuentran secuenciados los genomas completos de *T. versicolor* (Floudas *et al.*, 2012), *T. cinnabarina* (Busk *et al.*, 2014), *T. hirsuta* (Pavlov *et al.*, 2015), *T. pubescens* (no publicado, 2016) y *T. polizona* (no publicado, 2017) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En esta tesis se utilizó el genoma de *T. versicolor* como referencia para la predicción de las proteínas secretadas por *T. villosa* LBM 033 en las

condiciones estandarizadas de cultivo. Se lograron identificar y caracterizar diecisiete proteínas, nueve de las cuales presentaron al menos dos péptidos únicos, siendo esta la condición necesaria para asegurar su identidad con la máxima confianza (Borin *et al.*, 2015). El 66 % de las proteínas secretadas por *T. villosa* en las condiciones estandarizadas de cultivo correspondieron a enzimas relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica.

Las vías de degradación de sustratos naturales por hongos individuales están determinadas por los perfiles de enzimas extracelulares (Vasina *et al.*, 2016). La hidrólisis de la lignocelulosa a azúcares fermentables requiere de la acción de un cóctel de enzimas lignocelulolíticas cuya producción es dependiente de diferentes fuentes de carbono, es por ello que la elección de dicha fuente es un factor muy importante durante la producción de celulasas (Liu *et al.*, 2013). En este estudio, se detectaron varias lignocelulasas cuando se utilizó celulosa cristalina como fuente de carbono.

Las celulasas son enzimas inducibles y su producción está controlada finamente por mecanismos de activación y represión. De acuerdo con la concepción actualmente aceptada de los mecanismos de inducción de las celulasas, estas son inducidas en presencia de compuestos de bajo peso molecular, tales como monosacáridos o disacáridos y son reprimidas cuando se dispone de azúcares fácilmente utilizables (Saloheimo *et al.*, 2000; Behera *et al.*, 2017). Como sabemos, la celulosa es uno de los sustratos más adecuados para inducir celulasas en muchos hongos (Liao *et al.*, 2014). Sin embargo, los polisacáridos son demasiado grandes para entrar en las células. Es por ello, que se propone la existencia de cantidades basales de celulasas capaces de hidrolizar la holocelulosa y en algunos casos de convertir adicionalmente los productos por transglucosilación antes de funcionar como inductores fisiológicos (Singhanian *et al.*, 2016).

El primer factor de transcripción implicado en la degradación de la biomasa celulósica identificado fue XlnR, que media la inducción desencadenada por D-xilosa de genes xilanolíticos y celulolíticos en *Aspergillus*. (Tani *et al.*, 2014). Las proteínas ACEI (Saloheimo *et al.*, 2000) y ACEII (Aro *et al.*, 2001) reprimen y activan respectivamente la transcripción uniéndose específicamente a las regiones promotoras de *cbhs*.

Por otro lado, la presencia de glucosa, fácil de metabolizar, conduce a la represión de los genes necesarios para el uso de otras fuentes de carbono. El mecanismo se denomina represión por glucosa. En los hongos filamentosos, la represión por glucosa es controlada a través de los factores de transcripción creA y creI. La expresión de creI en *T. reesei* está regulada por la fuente de carbono, y es mayor en presencia de una fuente de carbono inductor que en presencia de glucosa (Singhania *et al.*, 2016).

Los fragmentos peptídicos únicos de *T. villosa* LBM 033 fueron idénticos a los de la CBHII de *T. versicolor* perteneciente a la familia 6 de las glicosil hidrolasas. En la mayoría de los hongos, incluyendo *T. reesei* y *P. oxalicum*, las CBHs son las principales celulasas en el sistema celulolítico (Liao *et al.*, 2014). Es por ello, que en el presente trabajo se estandarizaron las condiciones de cultivo con el fin de obtener un sobrenadante de cultivo enriquecido en CBHs. La identificación de la CBHII como principal componente en el sobrenadante de *T. villosa* LBM 033 confirma la actividad enzimática determinada y permite afirmar que el sobrenadante ha sido efectivamente estandarizado para las condiciones deseadas. A partir de estos péptidos únicos se diseñaron cebadores degenerados con los cuales se pretende lograr secuenciar el gen *cbhII* de *T. villosa* en un futuro próximo.

En un interesante estudio, Levine *et al.* (2011) describieron un marco basado en modelos que permitió encontrar la composición óptima de mezclas de EGs y CBHs para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos, demostrando que las velocidades de hidrólisis dependen de la naturaleza del sustrato. La mezcla más eficiente fue 1: 0: 1 EG2: CBHI: CBHII a las 24 h y 1: 1: 0 a las 72 h. Es decir, según este modelo un sobrenadante eficiente para una hidrólisis de 24 h debería contener CBHs del tipo II.

Además, se encontraron seis proteínas cuya función biológica está relacionada con la degradación de la lignocelulosa: cinco peroxidasas (MnPs y LiPs) y una celobiosa-deshidrogenasa.

La producción de peroxidasas parece ser una característica común de los hongos de pudrición blanca (Alfaro *et al.*, 2014) y su presencia está limitada a unas pocas familias de macrohongos (Agaricales, Corticiales, Polyporales, Hymenochaetales) (Janusz, 2013).

En este sentido, un cóctel que contenga enzimas hidrolíticas y oxidativas es favorable desde el punto de vista de la aplicación biotecnológica. Se sabe que la regulación de la expresión de las lacasas y las peroxidasas implica la participación de señales ambientales tales como concentración de carbono y nitrógeno, iones metálicos, presencia de xenobióticos, choque térmico y varias longitudes de luz diurna. Además, la composición del medio y las condiciones de crecimiento afectan fuertemente los patrones de expresión de sus isoenzimas en los hongos de pudrición blanca. La expresión de las enzimas ligninolíticas está regulada diferencialmente por la fuente de carbono y se produce a través del mecanismo cAMP debido a la existencia de sitio creA en las regiones promotoras. En hongos filamentosos, creA reprime la expresión de celulasas y xilanasas, lo que lleva a la conclusión de que la producción de todas las enzimas implicadas en la degradación de la madera puede ser regulada globalmente por las proteínas creA. A su vez, la producción de LiP y MnP también se ve afectada por la concentración de nitrógeno en el medio así como la relación carbono/nitrógeno en varias especies de hongos de pudrición blanca. Además, es posible que para algunas especies la peptona pueda ser una posible fuente orgánica de nitrógeno durante la producción de MnPs (Janusz *et al.*, 2013, Vasina *et al.*, 2017). Por ejemplo, Sarkar *et al.* (1997) encontraron altos aumentos de los niveles de MnPs cuando *Pleurotus ostreatus* se cultivó en presencia de peptona, tartrato de amonio y glucosa.

En relación a la celobiosa-deshidrogenasa Hori *et al.* (2013), compararon los perfiles proteicos secretados de hongos de pudrición blanca con los de hongos de pudrición parda cuando estos crecieron usando álamo de tierra como única fuente de carbono y encontraron que las hidrolasas glicosídicas GH6, GH7, LPMO (GH61) y celobiosa deshidrogenasa fueron segregadas solamente por los hongos de pudrición blanca.

No existe una gran cantidad de investigaciones de análisis proteómicos en *Trametes*. Un análisis del secretoma de *T. versicolor*, por ejemplo, dio como resultado la identificación de 218 proteínas, incluyendo 65 glicosil hidrolasas, 27 peptidasas, 8 oxidasas relacionadas con la degradación de la lignina, 5 lipasas, 4 Peroxidasas, 3 MnPs y versátil peroxidasas y 44 proteínas no caracterizadas (Floudas *et al.*, 2012).

Lebrun *et al.* (2010) realizaron un análisis 1D-PAGE-LC-MS del efecto de los iones metálicos (Zn, Cu, Pb y Cd) en el perfil de secreción de *T. versicolor*, con especial énfasis en las hidrolasas extracelulares y oxidasas ligninolíticas. Sus resultados mostraron que la exposición de *T. versicolor* a iones metálicos modificó su perfil de secreción de diferentes maneras. Mientras que la actividad de las hidrolasas fue inhibida por metales simples o cócteles de metales, las actividades de oxidasas fueron estimuladas específicamente por Cu y Cd (individualmente o en cócteles). Además, el patrón de glicosilación de dos lacasas se vio afectado por la presencia de los iones metálicos.

Vasina *et al.* (2016) realizaron un análisis de secretoma en *T. hirsuta* cultivado sobre un medio sintético y un sustrato lignocelulósico.

Ji *et al.* (2012) estudiaron las proteínas secretadas por *T. troglia* a través de 1D-PAGE-LC-MS. Las proteínas identificadas (64) se clasificaron en cinco categorías: enzimas de pared celular y degradación de la lignina (29 %), proteínas del metabolismo de los carbohidratos (20 %), proteínas del metabolismo de los ácidos grasos (11 %), proteínas del metabolismo de proteínas (11 %) y otras proteínas (29 %).

Podemos concluir que la composición del secretoma de *T. villosa* LBM 033 dependió de la naturaleza del sustrato. Estos resultados indican que la producción más eficiente de enzimas lignocelulósicas podrá ser inducida por sustratos más complejos.

7. CONCLUSIONES

- ☛ El *screening* inicial realizado en este trabajo permitió detectar 11 políporos aislados de Misiones (Argentina) con capacidad celulolítica, la cual podría ser aprovechada en procesos biotecnológicos como la etapa de hidrólisis en la producción de bioetanol. Además, se describieron métodos fluorométricos rápidos y eficientes para la detección de la actividad CBH y BGL.
- ☛ El aislamiento LBM 033 presentó los títulos más altos de actividad EG, BGL y CBH, emergiendo como el mejor candidato para generar celulasas que pudieran ser aplicadas en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos pretratados.
- ☛ La identificación del aislamiento LBM 033 a nivel de especie como *Trametes villosa* fue fuertemente soportada a través del alineamiento múltiple de secuencias de dos marcadores moleculares y la construcción de árboles mediante dos métodos diferentes.
- ☛ La actividad CBH de *T. villosa* LBM 033, al igual que otras celulasas fúngicas, depende en gran medida de las fuentes de carbono y de nitrógeno presentes en el medio. El medio de cultivo obtenido para este hongo fue enriquecido en CBH logrando la máxima actividad enzimática cuando fue suplementado con 15 g/l de celulosa cristalina y 3 g/l de peptona y sulfato de amonio.
- ☛ La temperatura óptima de la CBH de *T. villosa* LBM 033 estuvo dentro del rango encontrado para la mayoría de las celulasas fúngicas: 60°C. La termoestabilidad fue mayor a 30°C seguida de 50°C, disminuyendo a temperaturas más elevadas probablemente por desnaturalización de la estructura enzimática. El pH óptimo de la CBH de *T. villosa* LBM 033 también estuvo dentro del rango encontrado para las celulasas fúngicas: 4,8; pH en el cual, la actividad enzimática fue más estable. Estos valores de temperatura y pH son óptimos para llevar a cabo la hidrólisis enzimática en condiciones suaves, lo cual evitaría la corrosión de los biorreactores.

- ☛ El sobrenadante estandarizado de *T. villosa* LBM 033 enriquecido en CBHs presentó además títulos elevados de otras actividades enzimáticas necesarias para la hidrólisis de los sustratos holocelulósicos. Dicho sobrenadante fue capaz de hidrolizar la CMC y la PASC hasta celobiosa, evidenciando y confirmando la actividad CBH. Además se obtuvo glucosa, la cual podría ser fermentada a etanol. A su vez, se logró hidrolizar la xilosa hasta xilooligosacáridos. Estos resultados demuestran el potencial del cóctel enzimático obtenido para aplicarse en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica.
- ☛ La hidrólisis sobre el residuo de cebada utilizando el cóctel enzimático de *T. villosa* LBM 033 permitió obtener un 30 % de sacarificación de la holocelulosa, representado probablemente por oligosacáridos reductores.
- ☛ En el análisis de las proteínas secretadas en el medio estandarizado de *T. villosa* LBM 033 mediante espectrometría de masas se obtuvieron dos péptidos únicos que fueron idénticos a la CBHII de *T. versicolor*, validando nuevamente la estandarización del medio.
- ☛ El 66 % de las proteínas secretadas por *T. villosa* LBM 033 en las condiciones estandarizadas estuvieron relacionadas con la bioconversión de la biomasa lignocelulósica. En este sentido, un cóctel que contenga enzimas hidrolíticas y oxidativas es favorable desde el punto de vista de la aplicación biotecnológica.
- ☛ Dado que el elevado costo de las celulasas actualmente disponibles constituye el cuello de botella en la producción de bioetanol de segunda generación económicamente competitivo con los combustibles fósiles y que las CBHs pueden hidrolizar celulosa altamente cristalina, este trabajo demostró que los macrohongos de Misiones, como *T. villosa* LBM 033 pueden constituir una valiosa fuente de celulasas enriquecidas en CBHs. Es importante continuar con los estudios de sacarificación utilizando *T. villosa* LBM 033 en búsqueda de las condiciones óptimas para mejorar este proceso.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abril, D., & Abril, A. (2009). Ethanol from lignocellulosic biomass. *Ciencia e Investigación Agraria*, 36(2), 163-176.

Acharya, P. B., Acharya, D. K., & Modi, H. A. (2008). Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *African Journal of Biotechnology*, 7(22), 4147-4152.

Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631-653.

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675-685.

Alam, M. Z., Sultana, M., & Anwar, M. N. (2013). Isolation, identification and characterization of four cellulolytic actinomycetes and their cellulases. *Chittagong University Journal of Biological Sciences*, 6(1-2), 159-173.

Alfaro, M., Oguiza, J. A., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *Journal of Proteomics*, 102, 28-43.

Alfonsel, J., Negro, A., Saez, A., & Martin, M. (1986). Actividad enzimática del complejo celulolítico producido por *Trichoderma reesei*. *Publ./Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas*.

Arhipova, N., Gaitnieks, T., Donis, J., Stenlid, J., & Vasaitis, R. (2011). Decay, yield loss and associated fungi in stands of grey alder (*Alnus incana*) in Latvia. *Forestry*, 84(4), 337-348.

Aro, N., Saloheimo, A., Ilmén, M., & Penttilä, M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24309-24314.

Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 501-521.

Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J. S., Borrusch, M. S., & Walton, J. D. (2010). Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 22.

- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases–Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197-210.
- Bhattacharya, A. S., Bhattacharya, A., & Pletschke, B. I. (2015). Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. *Biotechnology Letters*, 37(6), 1117-1129.
- Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., & Pandey, A. (2011). Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. En: Pandey A., Larroche C., Ricke S. C., Dussap C. G., Gnansounou, E. ed. *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes*. Burlington: Academic Press, 229-250.
- Borin, G. P., Sanchez, C. C., de Souza, A. P., de Santana, E. S., de Souza, A. T., Leme, A. F. P., & de Castro Oliveira, J. V. (2015). Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS One*, 10(6), e0129275.
- Brijwani, K., Oberoi, H. S., & Vadlani, P. V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45(1), 120-128.
- Bukhtojarov, F. E., Ustinov, B. B., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., & Sinitsyn, A. P. (2004). Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. *Biochemistry (Moscow)*, 69(5), 542-551.
- Busk, P. K., Lange, M., Pilgaard, B., & Lange, L. (2014). Several genes encoding enzymes with the same activity are necessary for aerobic fungal degradation of cellulose in nature. *PloS one*, 9(12), e114138.
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., & Henrissat B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233-238 [PMID: 18838391].
- Carlson, A., Justo, A., & Hibbett, D. S. (2014). Species delimitation in *Trametes*: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia*, 106(4), 735-745.
- Castrillo, M. L. (2015). Caracterización de celulasas secretadas por aislamientos de *Trichoderma*, nativos de la provincia de Misiones (Argentina) aplicables en la etapa de sacarificación (tesis doctoral). Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina.

Chang, C. J., Wu, C. P., Lu, S. C., Chao, A. L., Ho, T. H. D., Yu, S. M., & Chao, Y. C. (2012). A novel exo-cellulase from white spotted longhorn beetle (*Anoplophora malasiaca*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9), 629-636.

Chen, H., & Fu, X. (2016). Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, 468-478.

Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., & Qu, Y. (2010). Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 444-449.

Chukeatirote, E., Maharachchikumbura, S. S., Wongkham, S., Sysouphanthong, P., Phookamsak, R., & Hyde, K. D. (2012). Cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I genes from some basidiomycetes. *Mycobiology*, 40(2), 107-110.

Conesa, C., Seguí, L., & Fito, P. (2013). Sacarificación de residuos industriales de piña con mezclas de enzimas comerciales. Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia, España. Pág, 10-25.

Coniglio, R. O., Fonseca, M. I., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2017). Screening of new secretory cellulases from different supernatants of white rot fungi from Misiones, Argentina. *Mycology*, 8(1), 1-10.

Crimes, J., Isafiade, A. J., Fraser, D. M., Short, M., & Bonomi, A. (2017). Assessment of pre-treatment technologies for bioethanol production from sugarcane bagasse considering economics and environmental impact. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 12(2), 212-229.

Cui, D. Z., Zhao, M., Yang, H. Y., Wang, C. I., & Dai, H. B. (2011). Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera based on internal transcribed spacer (ITS) and nearly complete mitochondrial small subunit ribosomal DNA (mt SSU rDNA) sequences. *African Journal of Biotechnology*, 10(79), 18111-18121.

Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6), 578.

Dave, B. R., Parmar, P., Sudhir, A., Singal, N., & Subramanian, R. B. (2014). Cellulases production under solid state fermentation using agro waste as a substrate and its application in saccharification by *Trametes hirsuta* NCIM. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(3), 203.

Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., & Goyal, A. (2011). Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme Research*, 2011, ID 151656.

Deswal, D., Gupta, R., & Kuhad, R. C. (2012). Enhanced exoglucanase production by brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 and its application for cellulose saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(7), 2004-2016.

Dojnov, B., Grujić, M., & Vujčić, Z. (2015). Reliable simultaneous zymographic method of characterization of cellulolytic enzymes from fungal cellulase complex. *Electrophoresis*, 36(15), 1724-1727.

Druzhinina, I. S., & Kubicek, C. P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microbial Biotechnology*. 10(6), 1485-1499.

Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*, 30,1-4.

Falkoski, D. L., Guimarães, V. M., De Almeida, M. N., Alfenas, A. C., Colodette, J. L., & De Rezende, S. T. (2012). Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(6), 1586-1603.

Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., & Salazar, G. A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D279-D285.

Floudas, D., *et al.*, (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 336(6089), 1715-1719.

Fonseca, M. I., Fariña, J. I., Sadañoski, M. A., D'Errico, R., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2015). Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 443-451.

Fonseca, M. I., Tejerina, M. R., Sawostjanik-Afanasiuk, S. S., Giorgio, E. M., Barchuk, M. L., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2016). Preliminary studies of new strains of *Trametes* sp. from Argentina for laccase production ability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 287-297.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268.

Giorgio E. M. (2014). Contribución al estudio fisiológico de hongos del phylum basidiomycota autóctonos de la selva subtropical de Misiones (Argentina): caracterización de endo- β -1,4-glucanasas involucradas en la transformación de la biomasa lignocelulósica (tesis doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interes agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17-24.

Gonçalves, V. N., Carvalho, C. R., Johann, S., Mendes, G., Alves, T. M., Zani, C. L., & Rosa, C. A. (2015). Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, 38(8), 1143-1152.

Gonzalez E. A. (2013) Aislamiento e Identificación de hongos de pudrición blanca con capacidad ligninolítica nativos de la Selva Subtropical Misionera (tesis de grado). Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina.

Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., & Siddiqui, K. S. (2016). Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, 16(1), 1-16.

Guglielmo, F., Bergemann, S. E., Gonthier, P., Nicolotti, G., & Garbelotto, M. (2007). A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1490-1507.

Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550-567.

Gusakov, A. V., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Ustinov, B. B., Okunev, O. N., Burlingame, R., & Sinitsyn, A. P. (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5), 1028-1038.

Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Salanovich, T. N., Bukhtojarov, F. E., Markov, A. V., Ustinov, B. B., & Burlingame, R. (2005). Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of *Chrysosporium lucknowense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), 57-69.

Gutiérrez-Soto, G., Medina-González, G. E., García-Zambrano, E. A., Treviño-Ramírez, J. E., & Hernández-Luna, C. E. (2015). Selection and characterization of a native *Pycnoporus sanguineus* strain as a lignocellulolytic extract producer from submerged cultures of various agroindustrial wastes. *BioResources*, 10(2), 3564-3576.

- Hamada, N., Ishikawa, K., Fuse, N., Kodaira, R., Shimosaka, M., Amano, Y., & Okazaki, M. (1999). Purification, characterization and gene analysis of exo-cellulase II (Ex-2) from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(4), 442-451.
- Han, M. L., Chen, Y. Y., Shen, L. L., Song, J., Vlasák, J., Dai, Y. C., & Cui, B. K. (2016). Taxonomy and phylogeny of the brown-rot fungi: Fomitopsis and its related genera. *Fungal Diversity*, 80(1), 343-373.
- Hanif, A., Yasmeeen, A., & Rajoka, M. I. (2004). Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 94(3), 311-319.
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10-18.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813), 804-807.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(4), 378-379.
- Hong, J., Tamaki, H., Yamamoto, K., & Kumagai, H. (2003). Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(1), 42-50.
- Hori, C., Gaskell, J., Igarashi, K., Samejima, M., Hibbett, D., Henrissat, B., & Cullen, D. (2013). Genomewide analysis of polysaccharides degrading enzymes in 11 white-and brown-rot Polyporales provides insight into mechanisms of wood decay. *Mycologia*, 105(6), 1412-1427.
- Horisawa, S., Sakuma, Y., & Doi, S. (2013). Identification and species-typing of wood rotting fungi using melting curve analysis. *Journal of Wood Science*, 59(5), 432-441.
- Irbe, I., Elisashvili, V., Asatiani, M. D., Janberga, A., Andersone, I., Andersons, B., & Grinins, J. (2014). Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 71-78.

Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 756-769.

Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(1), 1-12.

Ji, X. L., Zhang, W. T., Gai, Y. P., Lu, B. Y., Yuan, C. Z., Liu, Q. X., & Mu, Z. M. (2012). Patterns of lignocellulose degradation and secretome analysis of *Trametes trogii* MT. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 55-62.

Jia, J., Dyer, P. S., Buswell, J. A., & Peberdy, J. F. (1999). Cloning of the cbhI and cbhII genes involved in cellulose utilisation by the straw mushroom *Volvariella volvacea*. *Molecular and General Genetics*, 261(6), 985-993.

Justo, A., & Hibbett, D. S. (2011). Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon*, 60(6), 1567-1583.

Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203.

Kachlishvili, E., Khardziani, T., Metreveli, E., Kobakhidze, A., & Elisashvili, V. (2012). Screening of novel basidiomycetes for the production of lignocellulolytic enzymes during fermentation of food wastes. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology*, 1(1), 9-15.

Karaman, M., Novakovic, M., & Matavuly, M. (2012). Fundamental fungal strategies in restoration of natural environment. En: Paz Silva A. & Sol M. Ed. *Fungi: Types, environmental impact and role in disease*. Nova Science Publishers Inc., 167-214.

Koontz, L. (2014). TCA precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 3-10.

Kristensen, J. B., Felby, C., & Jørgensen, H. (2009). Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156(1-3), 127-132.

Kuhad, R. C., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. K., Kaur, A., & Karp, M. (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 249-272.

Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*. a multigene approach. *Mycological Research*, 106(7), 757-767.

- Kumar, A., Gautam, A., & Dutt, D. (2016). Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: an overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7(03), 149-168.
- Kumar, R., & Wyman, C. E. (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*, 25(2), 302-314.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lahjouji, K., Storms, R., Xiao, Z., Joung, K. B., Zheng, Y., Powlowski, J., & Varin, L. (2007). Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 337-346.
- Lantz, S. E., Goedegebuur, F., Hommes, R., Kaper, T., Kelemen, B. R., Mitchinson, C., & Larenas, E. A. (2010). *Hypocrea jecorina* CEL6A protein engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 20.
- Lebrun, J. D., Demont-Caulet, N., Cheviron, N., Laval, K., Trinsoutrot-Gattin, I., & Mougin, C. (2011). Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: A study of enzymatic system in *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 82(3), 340-345.
- Lee, K. M., Moon, H. J., Kalyani, D., Kim, H., Kim, I. W., Jeya, M., & Lee, J. K. (2011). Characterization of cellobiohydrolase from a newly isolated strain of *Agaricus arvensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(7), 711-718.
- Lesage-Meessen, L., Haon, M., Uzan, E., Levasseur, A., Piumi, F., Navarro, D., & Lomascolo, A. (2011). Phylogeographic relationships in the polypore fungus *Pycnoporus* inferred from molecular data. *FEMS Microbiology Letters*, 325(1), 37-48.
- Levin, L., & Forchiassin, F. (1997). Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes troglia*. *Revista Argentina de Microbiología*, 29, 16-23.
- Levine, S. E., Fox, J. M., Clark, D. S., & Blanch, H. W. (2011). A mechanistic model for rational design of optimal cellulase mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(11), 2561-2570.
- Li, Y. L., Li, D. C., & Teng, F. C. (2006). Purification and characterization of a cellobiohydrolase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilus* CT2. *Acta Microbiologica Sinica*, 46(1), 143-146.

- Liao, H., Li, S., Wei, Z., Shen, Q., & Xu, Y. (2014). Insights into high-efficiency lignocellulolytic enzyme production by *Penicillium oxalicum* GZ-2 induced by a complex substrate. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 162.
- Liew, C. Y., Husaini, A., Hussain, H., Muid, S., Liew, K. C., & Roslan, H. A. (2011). Lignin biodegradation and ligninolytic enzyme studies during biopulping of *Acacia mangium* wood chips by tropical white rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1457-1468.
- Limam, F., Chaabouni, S. E., Ghir, R., & Marzouki, N. (1995). Two cellobiohydrolases of *Penicillium occitanis* mutant Pol 6: Purification and properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(4), 340-346.
- Liu, D., Li, J., Zhao, S., Zhang, R., Wang, M., Miao, Y., & Shen, Q. (2013). Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 149.
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799-1808.
- Lomascolo, A., Cayol, J. L., Roche, M., Guo, L., Robert, J. L., Record, E., & Asther, M. (2002). Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycological Research*, 106(10), 1193-1203.
- Mahmood, R. T., Asad, M. J., Mehboob, N., Mushtaq, M., Gulfraz, M., Asgher, M., & Hadri, S. H. (2013). Production, purification, and characterization of exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(4), 895-908.
- Malysheva, V. F., & Zmitrovich, I. V. (2011). Testing the *Trametes hirsuta* complex. *Nova Hedwigia*, 93(1-2), 57-71.
- Manavalan, T., Manavalan, A., & Heese, K. (2015). Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology*, 70(4), 485-498.
- Mandels, M., & Reese, E. T. (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, 79(6), 816.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3), 119-131.

Matheny, P. B. (2005). Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(1), 1-20.

Mathieu, Y., Gelhaye, E., Dumarçay, S., Gérardin, P., Harvengt, L., & Buée, M. (2013). Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology. *Journal of Microbiological Methods*, 92(2), 157-163.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Najafi, G., Ghobadian, B., Tavakoli, T., & Yusaf, T. (2009). Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6), 1418-1427.

Nanda, S., Mohammad, J., Reddy, S. N., Kozinski, J. A., & Dalai, A. K. (2014). Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4(2), 157-191.

NCBI, R. C. (2017). Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D12.

Niranjane, A. P., Madhou, P., & Stevenson, T. W. (2007). The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1464-1468.

Ogórek, R., Kozak, B., Višňovská, Z., & Tančinová, D. (2017) Phenotypic and genotypic diversity of airborne fungal spores in Demänovská Ice Cave (Low Tatras, Slovakia). *Aerobiologia*, 1-16.

Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 7.

Ortiz-Monsalve, S., Dornelles, J., Poll, E., Ramirez-Castrillón, M., Valente, P., & Gutterres, M. (2017). Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 437-451.

Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 10.

Pavlov, A. R., Tyazhelova, T. V., Moiseenko, K. V., Vasina, D. V., Mosunova, O. V., Fedorova, T. V., & Slesarev, A. I. (2015). Draft genome sequence of the fungus *Trametes hirsuta* 072. *Genome Announcements*, 3(6), e01287-15.

Prasad, S., Singh, A., & Joshi, H. C. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1), 1-39.

Rajchenberg, M. (2006). Los poliporos (Basidiomycetes) de los bosques andino patágonicos de Argentina. *Bibliotheca Mycologica* 201: 1–300.

Rodhe, A. V., Sateesh, L., Sridevi, J., Venkateswarlu, B., & Rao, L. V. (2011). Enzymatic hydrolysis of sorghum straw using native cellulase produced by *T. reesei* NCIM 992 under solid state fermentation using rice straw. *3 Biotech*, 1(4), 207-215.

Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337-353.

Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., & Benjamin, S. (2016). An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *Journal of Nutrition and Food Science*, 6(1), 1-13.

Salcedo Mendoza, J. G., Flórez Pardo, L. M., & López Galán, J. E. (2011). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna*, 78(169), 182-190.

Saloheimo, A., Aro, N., Ilmén, M., & Penttilä, M. (2000). Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5817-5825.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185-194.

Sarkar, S., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (1997). Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1), 23-30.

Shahzadi, T., Mehmood, S., Irshad, M., Anwar, Z., Afroz, A., Zeeshan, N., & Sughra, K. (2014). Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(03), 246.

- Shin, K., Kim, Y. H., Jeya, M., Lee, J. K., & Kim, Y. S. (2010). Purification and characterization of a thermostable cellobiohydrolase from *Fomitopsis pinicola*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(12), 1681-1688.
- Singhania, R., Adsul, M., Pandey, A. & Patel, A. (2016). Cellulases. En: Pandey A., Negi S., Soccol C. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. Elsevier, 73-101.
- Soliman, S. A., El-Zawahry, Y. A., & El-Mougith, A. A. (2013). Fungal biodegradation of agro-industrial waste. En: Kadla, P.J. *Cellulose-Biomass Conversion*. InTech, 75-100.
- Sotome, K., Hattori, T., Ota, Y., To-Anun, C., Salleh, B., & Kakishima, M. (2008). Phylogenetic relationships of Polyporus and morphologically allied genera. *Mycologia*, 100(4), 603-615.
- Sukumaran R.K., Singhania R.R., & Pandey A. (2005). Microbial cellulases—production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64 832–844.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
- Sweeney, M. D., & Xu, F. (2012). Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. *Catalysts*, 2(2), 244-263.
- Taipakova, S., Smailov, B., Stanbekova, G., & Bissenbaev, A. (2011). Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Cell & Molecular Biology*, 9(1), 53-61.
- Tani, S., Kawaguchi, T., & Kobayashi, T. (2014). Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4829-4837.
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780.
- Toda, H., Nagahata, N., Amano, Y., Nozaki, K., Kanda, T., Okazaki, M., & Shimosaka, M. (2008). Gene cloning of cellobiohydrolase II from the white rot fungus *Irpex lacteus* MC-2 and its expression in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(12), 3142-3147.
- Tomšovský, M., Kolařík, M., Pažoutová, S., & Homolka, L. (2006). Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia*, 82(3-4), 269-280.

Tuohy, M. G., Walsh, D. J., Murray, P. G., Claeysens, M., Cuffe, M. M., Savage, A. V., & Coughlan, M. P. (2002). Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1596(2), 366-380.

UniProt Consortium. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D158-D169.

Uusitalo, J. M., Nevalainen, K. H., Harkki, A. M., Knowles, J. K., & Penttilä, M. E. (1991). Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *Journal of Biotechnology*, 17(1), 35-49.

Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458-1480.

Vasaitis, R. I. M. V. Y. S., Burnevica, N. A. T. A. L. I. A., Uotila, A. N. T. T. I., Dahlberg, A. N. D. E. R. S., & Kasanen, R. (2016). Cut Picea abies stumps constitute low quality substrate for sustaining biodiversity in fungal communities. *Baltic Forestry*, 22(2), 239-245.

Vasina, D. V., Moiseenko, K. V., Fedorova, T. V., & Tyazhelova, T. V. (2017). Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta* 072. Absolute expression quantification of full multigene family. *PloS one*, 12(3), e0173813.

Vasina, D. V., Pavlov, A. R., & Koroleva, O. V. (2016). Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* s t. 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate. *BMC Microbiology*, 16(1), 106.

Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., & Baldrian, P. (2016). The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 388-401.

Vishwakarma, R., & Banerjee, R., (2016). Enhancement of sugar content of *Cyperus sp.* through cellulolytic enzymes for bioethanol generation. *Lignocellulose* 5(2), 94-105.

Vlasák, J., & Kout, J. (2011). Tropical *Trametes lactinea* is widely distributed in the eastern USA. *Mycotaxon*, 115(1), 271-279.

Wang, M., Li, Z., Fang, X., Wang, L., & Qu, Y. (2012). Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. In *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy*. Springer Berlin Heidelberg, 1-24.

Welti, S., Moreau, P. A., Favel, A., Courtecuisse, R., Haon, M., Navarro, D., & Lesage-Meessen, L. (2012). Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera, and description of a new genus *Leiotrametes*. *Fungal Diversity*, 55(1), 47-64.

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Wright, J., Lechner, E., & Popoff, O. (2008). Hongos. Atlas pictórico del Parque Nacional Iguazú. Ed. Lola. Argentina.

Wu, B., Zhao, Y., & Gao, P. J. (2006). Estimation of cellobiohydrolase I activity by numerical differentiation of dynamic ultraviolet spectroscopy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(6), 372-378.

Yamanaka, R., Soares, C. F., Matheus, D. R., & Machado, K. M. (2008). Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 78-84.

Yennamalli, R. M., Rader, A. J., Kenny, A. J., Wolt, J. D., & Sen, T. Z. (2013). Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 136.

Yoon, J. J., & Kim, Y. K. (2005). Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *The Journal of Microbiology*, 43(6), 487-492.

Zhang, Y. H. P., Cui, J., Lynd, L. R., & Kuang, L. R. (2006). A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*, 7(2), 644-648

Esta tesis fue realizada en el InBioMis bajo la dirección del Dr. P. Zapata y la Dra. M. Fonseca gracias a la adjudicación de una beca interna doctoral (temas estratégicos) otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al financiamiento de los siguientes proyectos:

☛ **UTILIZACIÓN DE ENZIMAS FÚNGICAS EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS II:
Determinación de las condiciones óptimas de producción de celulasas.**

Acreditación: CIDET – Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNaM. Con financiación externa solicitada a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación Argentina – PICT BIS.

Lugar: FCEQyN – UNAM

Período: 2011 – 2014

☛ **UTILIZACIÓN DE ENZIMAS FÚNGICAS EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS V:
Evaluación de su eficiencia en la sacarificación para la producción de bioetanol.**

Acreditación: CIDET – Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNaM. Con financiación externa solicitada a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación Argentina – PICT BIS.

Lugar: FCEQyN – UNAM.

Período: 2014 – 2016

Además, durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se realizó una pasantía en el Laboratorio de Energía, Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), dónde se llevaron a cabo los micro-ensayos de hidrólisis enzimática y el tratamiento de las muestras para identificar el conjunto de proteínas presentes en el medio optimizado.